

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Impacto de la deficiencia de C3 plasmático en la diferenciación y
función leucocitaria

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Anaïs Jiménez Reinoso

Director

José R. Regueiro González-Barros

Madrid, 2017

© Anaïs Jiménez Reinoso, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL
IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE C3
PLASMÁTICO EN LA DIFERENCIACIÓN Y
FUNCIÓN LEUCOCITARIAS

Anaïs Jiménez Reinoso

MADRID, 2017

Director: Dr. José R. Regueiro González-Barros



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I

TESIS DOCTORAL

Impacto de la deficiencia de C3 plasmático en la diferenciación y función leucocitaria

Esta memoria ha sido presentada por la licenciada Anaïs Jiménez Reinoso para optar al grado de Doctor por el programa de doctorado de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina (RD1393/2007).

DIRECTOR DE LA TESIS:

José R. Regueiro González-Barros

Dpto. de Microbiología I (Área Inmunología)

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital 12 de Octubre

Facultad de Medicina

Universidad Complutense

Este trabajo ha sido realizado en el Dpto. Microbiología I (Área Inmunología) y financiado con una Beca del Programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Economía y Competitividad (FPI BES-2012-055054), una beca para estancias cortas de la *European Federation of Immunological Societies* (EFIS-IL Short-Term Fellowship), y por los proyectos de investigación MINECO SAF2011-24235 y SAF2014-54708-R, CAM P2010/BMD-2316, y LAIR 2012/0070.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Dirección General de Universidades
e Investigación
CONSEJERÍA DE EDUCACIÓN

Comunidad de Madrid



Ami madre

Aquí está: la Tesis Doctoral; otra etapa que se cierra. Después de estos años quería agradecer su aportación a toda la gente que en mayor o menor medida ha contribuido a que esta tesis sea posible.

Agradezco a mi director de tesis, José R. Regueiro, haber apostado por mí y haberme confiado este proyecto. Parafraseándote, sin darnos cuenta la tesis pasa y los doctorandos cambiamos con ella; ahora lo veo. Gracias por enseñarme tanto y por tus consejos.

Al resto de profesores del departamento, gracias por vuestra ayuda y sugerencias, y especialmente a Pedro Roda, por tantas respuestas y haberme tratado como una IS.IS adoptiva.

A los pacientes, sus familiares y los donantes sanos, sin cuyas valiosas muestras este trabajo no podría haberse realizado; gracias. A Margarita López Trascasa, Elena Román, y Alberto López Lera, gracias por vuestra participación y por ser la conexión con los pacientes proporcionándome sus muestras.

A Santiago Rodríguez de Córdoba, por su colaboración en este proyecto con muestras, reactivos e ideas y por acogerme de vez en cuando en su laboratorio; gracias a Marta, Agus y Sheila por su ayuda y por hacerme las mini-estancias tan agradables.

A todos los estudiantes, becarios y resto de miembros de “Inmuno” y “Celular” con los que he compartido este tiempo en el departamento. Gracias a Juan L. y a Carmen D., y especialmente, gracias a Miguel y a Bea, por su paciencia con todas mis preguntas, por enseñarme tantas técnicas y por seguir ayudándome desde la distancia.

A Ana, por ser la mejor compañera con la que podía compartir este proyecto. Juntas hemos conseguido que el “Equipo C” haya llegado incluso a tierras escandinavas. Gracias por tantos momentos dentro y fuera del laboratorio, por tu fuerza ante las circunstancias y por tu amistad estos años.

A Patricia, gracias por esas tardes locas cerrando el departamento, por los consejos y tu ayuda en esta etapa, y por tus “qué horror” que tanta gracia me hacen. A Maleny, por compartir este camino que es terminar y escribir la tesis, por tus ánimos y tus consejos y por tu apoyo diario. A Miriam, por tu ayuda en tantas cosas, y por tu eterna sonrisa. A Marina, por tu gracia y salero segovianos y por tantos buenos momentos. A Rocío, gracias por tu ayuda en el labo en tantas ocasiones y por nuestros disfraces con los embalajes. Gracias chicas, por ser mis compañeras, pero también mis amigas. Sin olvidarme de Nacho, por tus críticas constructivas y a Bea, mi casi vecina, por tu actitud y tus consejos; gracias a los dos por haber podido compartir con vosotros esta última etapa.

To Kemper Lab for all your help. Thank you Claudia for giving me the opportunity of being in your lab at the KCL, for teaching me new techniques and for your attitude towards science. Especially, thanks to Giuseppina, Shinjini and Sira, for making my stay in London nicer, for your help and your friendship.

A todos mis amigos, por estar ahí siempre: gracias. A Patricia, por toda una vida de amistad y de risas, porque nada cambia a pesar de la distancia y por tu alegría ante la vida. A las Maravillas. Alicia, Elena de V., Elena R., Iria, Julia y María; gracias por tantos momentos, porque va avanzando la vida y aquí seguimos juntas. A mis compañeros de la UAM. AJ, Julia, Sol, Vero y Celia; gracias por las cenas, las risas, porque empezamos juntos Biología y mirad a dónde hemos llegado. A Serrano, Adri y especialmente a Santi y a Guti, por vuestra sabiduría (y no la mía), y por vuestra amistad estos años. A Irmina, por escucharme siempre, por tus consejos y por aquellos tiempos en el ISCIII; junto a Nahikari y a Marian, gracias chicas por esas tardes compartiendo tesis, experiencias y buenos momentos.

A mi familia, a los que están y a los que están más lejos... gracias por apoyarme en todos los sentidos. A mi abuela, por cuidarme, por su dedicación conmigo y por enorgullecerse como la que más con todos mis logros por pequeños que fueran. A Anuké, mi segunda madre pero también mi amiga, por tantos consejos, ayuda, paciencia y cariño; por ayudarme a crecer y hacerlo siendo más fuerte. A mi padre, mi hermano y Alessandra, y por supuesto, a Martín, a Guille y a Maruja, gracias a todos por ser la mejor familia. A Paula, por tu apoyo y porque sé que estarías orgullosa. A Isabel, Ana y Julio, por ser mi segunda familia y ayudarme en tantas cosas. A Adela y a José, por acogerme en la suya y por todo su cariño. A las Margas, Pedro, Javi&Nacho y a Marta, por ser también más familia que vecinos. A Lola, que llegaste sin preaviso y nos llenas con tu alegría y energía cada día.

A Alberto. Gracias por todo. Por estar a mi lado, a las duras, a las maduras y a las tantas de la noche los días de muestra. Por confiar en mí cuando yo no lo hacía y por tu paciencia y tu apoyo estos años en la tesis, pero sobre todo, en la vida. Por compartir conmigo esta etapa y las siguientes, y por crecer juntos. Gracias.

Y a mi madre: a ti te dedico esta tesis.

"The darkest hour is just before the dawn"
—Unknown—

"La ciencia... se suicida cuando adopta un credo"
—Thomas Henry Huxley—

0. ÍNDICE

ÍNDICE

I. RESUMEN	17
II. SUMMARY	23
III. ABREVIATURAS	29
IV. INTRODUCCIÓN	33
1. El sistema de complemento	35
1.1. Activación extracelular	37
1.1.1. Vía clásica	38
1.1.2. Vía de las lectinas	39
1.1.3. Vía alternativa	39
1.1.4. Amplificación y vía lítica terminal	40
1.1.5. Regulación de la activación extracelular del sistema de complemento	40
1.2. Activación intracelular	43
2. Papel del complemento en la diferenciación y función de linfocitos T	47
2.1. Diferenciación de linfocitos T	47
2.2. Participación del complemento en la diferenciación y en la función T	48
2.3. Regulación de los linfocitos T mediada por las DC y el complemento	49
3. Papel del complemento en la diferenciación y función de linfocitos B	51
3.1. Diferenciación de linfocitos B	51
3.2. Participación del complemento en la diferenciación y en la función B	52
4. Deficiencia de C3	55
4.1. Primaria	57
4.2. Secundaria	57
4.2.1. Deficiencia de factor	57
V. OBJETIVOS	59
VI. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. Pacientes	65
1.1. Deficiencia primaria de C3 plasmático	65
1.1.1. Familia C3.1	65
1.1.2. Familia C3.2	65
1.1.3. Familia C3.3	66
1.1.4. Familia C3.4	66
1.2. Deficiencia secundaria de C3 plasmático	66
1.2.1. Familia CFI.1	66
1.2.2. Familia CFI.2	66
2. Materiales	67
2.1. Células y líneas celulares	67
2.2. Reactivos y kits	67

2.3. Medios de cultivo, tampones y soluciones	69
2.4. Cebadores de la PCR	71
2.5. Anticuerpos	72
2.6. Aparatos y fungible de laboratorio	74
2.7. Software	75
3. Métodos	76
3.1. Técnicas bioquímicas	76
3.1.1. Nefelometría	76
3.1.2. ELISA	76
3.1.3. SDS-PAGE y Western blot	76
3.2. Técnicas de biología celular	77
3.2.1. Aislamiento de PBMC de sangre periférica	77
3.2.2. Cultivos celulares	77
3.2.3. Citometría de flujo extracelular	77
3.2.4. Citometría de flujo intracelular	78
3.2.5. Generación de células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC)	78
3.2.6. Generación y cultivo de líneas transformadas T y B	79
3.2.7. Microscopía de fluorescencia y confocal	80
3.2.8. Técnicas funcionales	81
3.2.8.1. Proliferación en respuesta a diferentes estímulos	81
3.2.8.2. Determinación de los títulos de anticuerpos en suero	82
3.3. Técnicas de biología molecular	82
3.3.1. Cribado de mutaciones y secuenciación génica	82
3.4. Análisis estadístico	82
3.5. Análisis <i>in silico</i>	82
VII. RESULTADOS	83
1. Clasificación de los individuos analizados	85
2. Leucocitos primarios de pacientes deficientes de C3 plasmático	88
2.1. Inmunofenotipo leucocitario	88
2.1.1. Linfocitos T	88
2.1.2. Células dendríticas	90
2.1.2.1. Diferenciación de células dendríticas <i>in vitro</i>	91
2.1.3. Linfocitos B	93
2.2. Función linfocitaria <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	95
2.3. Correlación entre C3 plasmático y frecuencia de subpoblaciones linfocitarias	99
3. Linfocitos transformados de pacientes deficientes de C3 plasmático	102
3.1. Contenido de C3 intracelular	102
3.2. Localización subcelular de C3	106
VIII. DISCUSIÓN	109
1. Pacientes estudiados	111

2.Efecto diferencial de la deficiencia de C3 en el desarrollo leucocitario	114
2.1.Efecto dosis-dependiente de la deficiencia de C3 en la diferenciación, pero no la función, de los linfocitos B	116
3.Activación intracelular de C3 en líneas celulares linfoblastoides	119
3.1.Detección de C3 intracelular en pacientes con deficiencia de C3 plasmático	119
3.2.Localización subcelular de los fragmentos de C3	121
IX· CONCLUSIONS	125
1.Impact of plasma C3 deficiency in leukocyte differentiation and function	127
2.Intracellular C3 activation in lymphoblastoid cell lines	127
X· ABSTRACT	129
XI· BIBLIOGRAFÍA	133
XII· ANEXOS	147
1.Consentimiento informado	149
2.Obtención del Título de Doctor con Mención Europea (RD1393/2007)	151
3.Currículum vitae	152
4.Publicaciones relevantes a esta tesis	155

I. RESUMEN

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El papel del complemento en la inmunobiología ha evolucionado notablemente desde que fue descrito inicialmente como un elemento clave de la inmunidad innata. Lejos de su visión tradicional como un simple elemento termolábil que complementaba la eliminación de microbios mediada por anticuerpos, hoy día el sistema de complemento es considerado como un puente entre la inmunidad innata y adaptativa¹.

De las más de 50 proteínas que lo componen, la proteína C3 es el eje central en el que convergen sus tres vías de activación y por ello, tiene un fuerte impacto en la regulación de la biología leucocitaria, especialmente en linfocitos T, B y células dendríticas (DC). Los antígenos solubles opsonizados por fragmentos plasmáticos de C3d(g) se unen a través de su receptor CD21 e inducen el reclutamiento de CD19 y CD81 para formar el co-receptor de linfocitos B, reduciendo significativamente el umbral de activación del receptor de linfocitos B². El receptor CD21, también conocido como receptor de complemento 2, es expresado por células dendríticas foliculares que capturan antígenos opsonizados con C3d(g) en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios, favoreciendo la maduración de la afinidad, el cambio de isotipo y la adquisición de memoria de linfocitos B naíf o primados³.

A pesar de que hace años ya se apuntó a una síntesis extra-hepática del complemento, con el tiempo han ido creciendo las evidencias que respaldan su síntesis local por diferentes tipos leucocitarios⁴. De hecho, los recientes hallazgos que exponen la existencia de un sistema de activación de C3 intracelular diferente al conocido plasmático con importantes consecuencias para la homeostasis y función de los linfocitos T ponen de manifiesto el alcance de la influencia de C3 en mamíferos⁵. En este contexto se ha visto que tanto los linfocitos T como las DC sintetizan fragmentos de C3 que actúan de forma autocrina y paracrina, favoreciendo la función de presentación antigénica de las DC e induciendo funciones efectoras en los linfocitos T⁶.

Por todo ello, el C3 plasmático o intracelular podrían considerarse como co-estimuladores de linfocitos T y B, pero la contribución relativa de sus señales no está bien caracterizada, y la mayoría de los estudios que apuntan al rol específico de fragmentos de complemento, especialmente en cuanto a la diferenciación de linfocitos B, están hechos en ratón. Una mejor caracterización pasaría por el empleo de muestras humanas, y más concretamente, de muestras de pacientes con deficiencia de C3 plasmático, ya sea primaria —debida a mutaciones en *C3*— o secundaria —por deficiencia en el regulador factor I, que desemboca en un consumo del C3 plasmático—. Sin embargo, esta deficiencia es una enfermedad extremadamente rara con muy baja prevalencia y menos de 50 casos reportados, lo que dificulta su estudio.

OBJETIVOS

En este trabajo proponemos que, dado que la deficiencia primaria de C3 plasmático mostraría defectos leucocitarios asociados a una mala señalización del C3 plasmático y del C3 intracelular, y que la deficiencia secundaria sólo mostraría los defectos asociados a la falta del C3 plasmático como consecuencia de su consumo, el estudio comparado de

la diferenciación y función leucocitarias en ambas deficiencias podría arrojar luz sobre el papel del C3 plasmático *versus* intracelular en la inmunidad adaptativa. Para abordar dicho estudio, por un lado hemos analizado qué efecto tiene la carencia de C3 plasmático sobre el fenotipo, diferenciación y función de linfocitos T y B, así como el fenotipo y diferenciación de DC, en muestras de 4 familias con mutaciones no descritas en C3 y en muestras de 2 familias con deficiencia de factor I. Por otro lado, hemos generados líneas T y B linfoblastoides derivadas de dichos individuos con deficiencia primaria o secundaria de C3 plasmático o de controles para analizar comparativamente su activación intracelular de C3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de estudiar cómo la reducción en los niveles de C3 plasmático puede afectar a la diferenciación leucocitaria, los pacientes deficientes primarios y secundarios de C3 plasmático, los portadores sanos y los donantes sanos se inmunofenotiparon y se compararon diferentes sub-poblaciones de linfocitos T y B, incluidas aquéllas que representaban estadios sucesivos de diferenciación. La diferenciación de los linfocitos T fue esencialmente normal, y no se detectaron diferencias significativas cuando se analizó a los individuos en función de un umbral de 40 mg/dL de C3 plasmático. Por el contrario, se observó un defecto en la diferenciación desde linfocitos B naíf a linfocitos B de memoria en ambos tipos de deficientes de C3 plasmático, primarios y secundarios, con un aumento de los linfocitos B naíf (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) y una disminución de los linfocitos B de memoria sin (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) y con cambio de isotipo (CD19⁺IgD⁻CD27⁺). Es más, dichos cambios eran significativos cuando los niveles de C3 plasmático estaban por debajo del umbral de 40 mg/dL. Curiosamente, a pesar de estos cambios a nivel sub-poblacional, los números absolutos de linfocitos de los pacientes con deficiencia de C3 plasmático se encontraban dentro de los rangos normales. El análisis *ex vivo* de las DC constató que las DC mieloides (BDCA1⁺BDCA2⁻), pero no las plasmacitoides (BDCA1⁻BDCA2⁺CD123⁺), estaban reducidas en las deficiencias primaria y secundaria de C3 plasmático, y que presentaban una expresión menor de HLA-DR.

Para explorar cómo el defecto en el desarrollo de memoria B manifestado en la deficiencia de C3 plasmático estaba relacionado con una alteración en las funciones T o B, se evaluaron la proliferación T y B *ex vivo* en respuesta a mitógenos y la función B *in vivo* —cuantificada en función de los niveles de inmunoglobulinas o de anticuerpos específicos frente a vacunas—. Los resultados mostraron que dichos parámetros funcionales T y B eran mayoritariamente normales en nuestra cohorte a pesar de sus niveles de C3 plasmático indetectables o disminuidos. A pesar de que la deficiencia de C3 se ha asociado con infecciones bacterianas recurrentes⁸ y una disminución de la proliferación frente a antígenos de recuerdo, ni los pacientes con deficiencia primaria ni los pacientes con deficiencia secundaria de C3 plasmático de nuestra cohorte mostraron características clínicas sugestivas de un defecto grave T o B, y su respuesta a mitógenos fue normal, del mismo modo que en lo publicado previamente⁷.

Dado que tanto la función T como la función B eran básicamente normales, para determinar un posible papel del C3 circulante (es decir, de fragmentos opsonizantes de C3) en la generación de los linfocitos B de memoria, se analizó la correlación entre los

niveles de C3 plasmático y las sub-poblaciones de linfocitos B o T en nuestra cohorte. Los resultados mostraron una correlación positiva de los niveles de C3 plasmático con la frecuencia de los linfocitos B sin cambio de isotipo y una correlación negativa con la de los linfocitos B naïf, ambas estadísticamente significativas, pero no con la frecuencia de linfocitos B totales. Los niveles de C3 plasmático también se correlacionaron positivamente con los niveles de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, aunque sin alcanzar significación estadística. En contraposición, la frecuencia de ninguna de las sub-poblaciones de linfocitos T analizadas se correlacionaba con los niveles de C3 plasmático.

Para el estudio de la activación intracelular de C3 se generaron líneas celulares puras T y B con el virus linfotrópico de células T humanas tipo I y con el virus de Epstein-Barr, respectivamente, y su contenido en C3 intracelular se analizó mediante citometría de flujo o mediante microscopía confocal empleando mAb específicos frente a dos neo-epítomos asociados a fragmentos de C3 (anti-C3a y anti-iC3b/C3dg). Los resultados mostraron que todos los linfocitos T y B testados procedentes de los individuos con deficiencia primaria o secundaria de C3 plasmático expresaban fragmentos intracelulares de C3 a unos niveles que eran indistinguibles de los de las células procedentes de donantes sanos, incluso cuando se compararon células de individuos por encima o por debajo del umbral de 40 mg/dL de C3 plasmático. Además, la expresión intracelular de C3a aumentó de forma similar en los linfocitos T de los pacientes con deficiencia de C3 plasmático y en los de los donantes sanos tras activación del receptor de linfocitos T, confirmando los datos publicados previamente⁵.

Cabe destacar que los fragmentos intracelulares de C3a y de iC3b/C3dg mostraron localizaciones subcelulares diferentes, de forma que iC3b/C3dg colocalizaba notablemente con el cis-Golgi. En comparación, el fragmento C3a no se asociaba a ninguno de los compartimentos testados (cis/trans-Golgi, endosomas tempranos y lisosomas) en las células del control, en cambio parecía estar débilmente asociado de forma no significativa a las vesículas trans-Golgi, pero sólo en las células procedentes de la deficiencia de C3 plasmático. Estos resultados sugieren una localización intracelular diferencial de las proteasas encargadas de generar esos fragmentos de complemento. Curiosamente, todos los fragmentos testados tendían a acumularse más en las células del deficiente de C3 plasmático que en las del control, especialmente en lisosomas.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que las señales que media el C3 plasmático, pero no el intracelular, son necesarias para una diferenciación B normal de un modo dependiente de los niveles de C3 plasmático, ya que tanto la deficiencia primaria como secundaria de C3 comparten un defecto en el desarrollo de linfocitos B de memoria con independencia del contenido intracelular de los linfocitos B. Cabe destacar que dicho defecto no se asocia en nuestra cohorte con un defecto en la función B cuantificada como proliferación en respuesta a diferentes estímulos o como producción de anticuerpos. Por el contrario, el C3 plasmático no parece estar participando en la diferenciación o función de los linfocitos T. También hemos detectado una reducción en la proporción de DC mieloides circulantes y en su expresión de HLA-DR en los individuos con deficiencia primaria y secundaria de

C3 plasmático. Los estudios con las líneas T y B linfoblastoides demuestran la existencia de un mecanismo de activación intracelular tanto en controles como en pacientes con deficiencia de C3 plasmático. La localización de los fragmentos intracelulares de C3 testados en vesículas cis-Golgi sostiene una ruta de biosíntesis/exocitosis del C3 intracelular. La mayor acumulación de C3a, iC3b y C3dg en los compartimentos subcelulares testados en las células procedentes de la deficiencia de C3 plasmático apoyan que la exocitosis de C3 está deteriorada en la deficiencia de C3 plasmático.

En conjunto nuestros resultados muestran que (i) el C3 plasmático genera señales críticas para el desarrollo de los linfocitos B, pero no T, de memoria, que el C3 intracelular es incapaz de restaurar, y que (ii) la deficiencia primaria de C3 plasmático no se asocia con una deficiencia de fragmentos de C3 intracelular equivalente en linfocitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
2. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; 271:348-50.
3. Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 2012; 37:199-207.
4. Jiménez-Reinoso A, Marin AV, Regueiro JR. Complement in basic processes of the cell. *Mol Immunol* 2017; 84:10-6.
5. Liszewski MK, Kolev M, Le Fric G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 2013; 39:1143-57.
6. Kolev M, Le Fric G, Kemper C. Complement — tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:811-20.
7. Ghannam A, Pernollet M, Fauquert JL, Monnier N, Ponard D, Villiers MB, et al. Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181:5158-66.

II. SUMMARY

II. SUMMARY

INTRODUCTION

The role of complement in immunobiology has greatly evolved since it was first described as a key element of innate immunity. Far from the traditional vision of complement as a simple heat-labile assistant in antibody-mediated killing of microbes, it is now recognized as a bridge between the innate and adaptive arms of immunity¹.

Among more than 50 proteins of the complement system, C3 is the central hub of the three complement pathways and thus has a strong impact in leucocyte biology, especially in T and B lymphocytes and in dendritic cells (DC). Soluble antigens containing the plasma C3 fragment C3d(g) due to opsonization will engage its receptor CD21 and induce the recruitment of CD19 and CD81 to form and trigger the B cell co-receptor, significantly lowering the activation threshold of B cell receptor signaling². CD21, also known as complement receptor 2, is expressed on follicular dendritic cells which capture C3d(g)-opsonized antigens in the secondary lymphoid organs germinal centers, enhancing the affinity maturation, isotype switching and memory acquisition of naïve or primed human B cells³.

Despite several years ago an extra-hepatic complement synthesis was described, increasing evidence have been accumulating supporting its local synthesis by different leukocyte types⁴. Indeed, the recent realization of an intracellular C3 activation system different from the extracellular with important consequences for T cell homeostasis and differentiation highlights the scope of C3 influences in mammals⁵. In this context, it has been shown that T lymphocytes as well as DC synthesize C3 fragments that act in an autocrine and paracrine manner, enhancing DC antigen presentation function and inducing T cell effector functions⁶.

Therefore, plasma or intracellular C3 could be considered as T and B cell co-stimulators, but the relative contribution of their signals is not well characterized, and most of the studies that point to a specific role of complement fragments, especially regarding to B lymphocyte differentiation, are developed in mice. A better characterization would include the use of human samples, and more specifically, samples from plasma C3 deficient-patient's samples, either primary —due to C3 mutations— or secondary —due to a deficiency in the regulator factor I, that leads to a plasma C3 consumption—. However, this deficiency is an extremely rare disease with very low prevalence and less than 50 cases reported, making it difficult to study.

OBJECTIVES

In this thesis, we propose that, given that primary plasma C3 deficiency would show leukocyte defects associated to impaired plasma C3- and intracellular C3-dependent signals, but secondary plasma C3 deficiency would show those related to impaired plasma C3 signals only, a study comparing the leukocyte differentiation and function in both deficiencies would shed light regarding the role of plasma *versus* intracellular C3 in adaptive immunity. To address this study, on one side we have analyzed the plasma C3 absence effect on T and B cell phenotype, differentiation and function, as well as on DC phenotype and differentiation, in 4 families with unpublished C3 mutations

and in 2 families with factor I deficiency. On the other side, we have generated T and B lymphoblastoid cell lines from primary or secondary plasma C3-deficient individuals or controls in order to analyze comparatively their intracellular C3 activation.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to study whether reduced plasma C3 levels could affect leukocyte differentiation, primary and secondary plasma C3-deficient patients, healthy carriers and healthy donors were immunophenotyped and compared for several T and B cell subsets, including those representing successive differentiation stages. T lymphocyte differentiation was essentially normal and no significant differences were detected when individuals above or below a 40 mg/dL plasma C3 threshold were compared. In contrast, impaired naïve to memory B cell differentiation was observed in both primary and secondary plasma C3-deficient patients, with increased naïve (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) B cells, and reduced unswitched (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) and switched (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) memory B cells. Indeed, such changes were significant when plasma C3 levels were below the 40 mg/dL threshold. Interestingly, absolute lymphocyte numbers from plasma C3-deficient patients were always within normal values. *Ex vivo* DC analysis showed that myeloid (BDCA1⁺BDCA2⁻), but not plasmacytoid (BDCA1⁻BDCA2⁺CD123⁺), DC were reduced in both primary and secondary plasma C3 deficiencies and exhibited reduced expression of HLA-DR.

To explore whether the defect in memory B cell development exhibited by plasma C3 deficiency was related to altered T or B cell function, *ex vivo* T and B cell proliferation in response to mitogens, or *in vivo* B cell function —measured as immunoglobulin or vaccine-specific antibody levels— were evaluated. The results showed that those functional T and B cell parameters were mostly normal in our cohort, despite their undetectable or ablated plasma C3 levels. Although C3 deficiency has been associated with recurrent bacterial infections and decreased proliferation against specific recall antigens, neither primary nor secondary plasma C3-deficient patients in our cohort displayed clinical features suggestive of severe T or B cell defects, and the response to mitogens was normal, as reported previously⁷.

Given that T and B cell function were basically normal, to further determine a possible role of circulating C3 (i.e., C3-opsonizing fragments) in the generation of memory B cells, we analyzed the correlation between plasma C3 levels and B or T cell subpopulations in our cohort. The results showed a positive correlation of plasma C3 levels with the frequency of unswitched memory B cells, and a negative correlation with that of naïve B cells, both statistically significant, but not with total B cell frequency. Plasma C3 levels also positively correlated with switched memory B cell levels, although without reaching statistical significance. In contrast, none of the T cell subpopulations analyzed correlated with plasma C3 levels.

To study intracellular C3 activation we generated pure T and B cell lines from our cohort with human T cell lymphotropic virus type 1 and Epstein-Barr virus, respectively, and analyzed their intracellular C3 content by flow cytometry or confocal microscopy using specific mAb against two C3-associated neo-epitopes (anti-C3a and anti-iC3b/C3dg). The results showed that all tested T and B cells derived from primary or secondary

plasma C3-deficient patients expressed intracellular C3 fragments at levels that were indistinguishable from those of healthy donors, even when individuals above or below (patients) the 40 mg/dL plasma C3 threshold were compared. In addition, intracellular C3a augmented similarly in T cells from plasma C3-deficient patients or HD after TCR activation, confirming previous data⁵.

Of note, intracellular C3a and iC3b/C3dg fragments showed different subcellular locations, with iC3b/C3dg found strongly associated to the cis-Golgi. In comparison, C3a fragment was slightly found in trans-Golgi vesicles, but only in cells derived from the plasma C3-deficient patient. These results suggest a differential intracellular location of the cleaving enzymes generating these complement fragments. Interestingly, all tested fragments tended to accumulate in higher proportion in T cells from the plasma C3 deficiency compared to control T cells, especially in lysosomes.

CONCLUSIONS

Our results show that plasma, but not intracellular, C3 signals is required for normal B cell differentiation in a plasma C3 level-dependent fashion, as primary and secondary C3 deficiency share an impaired memory B cell development independently of the intracellular C3 content of B lymphocytes. Of note, the defect is not associated with impaired B cell function in our cohort, as measured by proliferation in response to mitogens or antibody production. In contrast, plasma C3 is seemingly not involved in the differentiation or function of T lymphocytes. We have also detected a reduction in the proportion of myeloid circulating DC and their HLA-DR expression in individuals with both primary and secondary plasma C3 deficiency. Studies with lymphoblastoid T and B cell lines demonstrated the existence of an intracellular C3 activation system in controls as well as plasma C3-deficient patients. Intracellular C3 fragments' localization in cis-Golgi vesicles sustained a biosynthetic/exocytic pathway for intracellular C3 activation. Higher C3a, iC3b and C3dg accumulation in T cells from plasma C3 deficiency in all tested subcellular compartments supports an exocytosis impairment in plasma C3 deficiency.

Taken together, our results showed that (i) plasma C3 generates critical signals for the development of memory B, but not T, lymphocytes, which intracellular C3 cannot replace; and (ii) primary plasma C3 deficiency is not associated to an equivalent intracellular C3 fragment deficiency in lymphocytes.

BIBLIOGRAPHY

1. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
2. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; 271:348-50.
3. Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 2012; 37:199-207.
4. Jiménez-Reinoso A, Marin AV, Regueiro JR. Complement in basic processes of the cell. *Mol Immunol* 2017; 84:10-6.
5. Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 2013; 39:1143-57.
6. Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement — tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:811-20.
7. Ghannam A, Pernollet M, Fauquert JL, Monnier N, Ponard D, Villiers MB, et al. Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181:5158-66.

III. ABREVIATURAS

III. ABREVIATURAS

Tabla A. Clave de abreviaturas	
A	amperios
APC	célula presentadora de antígeno
BCR	receptor de linfocitos B
CCP	<i>complement control protein</i>
CFI	factor I (gen)
CFSE	<i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CHO	línea celular epitelial de ovario de hámster
CI	control de isotipo
CM	<i>confocal microscopy</i> , microscopía confocal
CN	linfocitos T CD4 ⁺ central naïf
CR	<i>complement receptor</i> , receptor de complemento (1-4)
CTSL	catepsina L
DAF	<i>decay-accelerating factor</i> , factor acelerador de la disociación
DAMPs	patrones moleculares asociados al daño
DC	células dendríticas
EAE	encefalitis autoinmune experimental
EBV	virus de Epstein-Barr
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FC	<i>flow cytometry</i> , citometría de flujo
FDC	células dendríticas foliculares
FHL-1	<i>FH-like protein 1</i>
FI	factor I (proteína)
PE	ficoeritrina
GEO-MFI	media geométrica de la intensidad de fluorescencia
GNMP	glomerulonefritis membranoproliferativa
HC	<i>healthy carrier</i> , portador sano
HD	<i>healthy donor</i> , control sano
HTLV-I	<i>human T cell lymphotropic virus type 1</i> , virus linfotrópico de células T humanas tipo I
IL	interleucina
IL-2R α	receptor alfa de IL-2
IL-10R1	receptor alfa de la citocina IL-10
iTreg	linfocitos T reguladores inducidos
kDa	kilodaltons
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , anticuerpo monoclonal
MAC	complejo de ataque a membrana
MASP	serín proteasas asociadas a MBL
MBL	letinas de unión a manosa
MCP	<i>membrane cofactor protein</i> , proteína cofactora de membrana
mDC	células dendríticas mieloides
MDDC	células dendríticas derivadas de monocitos
MG	dominios macro-globulina
ND	<i>not determined</i> , no determinado
ns	<i>non-significant</i> , no significativo
O/N	<i>overnight</i> , durante la noche
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos

ABREVIATURAS

PBL	linfocitos de sangre periférica
PBMC	células mononucleares de sangre periférica
PC	célula plasmática
pDC	células dendríticas plasmacitoides
PHA-L	leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PRM	<i>pattern-recognition molecule</i> , molécula de reconocimiento de patrones
PWM	mitógeno extraído de la raíz de la <i>Phytolacca americana</i>
RCA	<i>regulators of complement activation</i> , reguladores de la activación de complemento
RTE	<i>recent thymic emigrants</i> , emigrantes recientes del timo
SCR	<i>short consensus repeats</i>
SD	desviación estándar
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SEB	<i>Staphylococcal enterotoxin B (superantigen)</i>
SEE	<i>Staphylococcal enterotoxin E (superantigen)</i>
TA	temperatura ambiente
TCR	receptor de linfocitos T
Tfh	linfocitos T <i>helper</i> foliculares
Th	linfocitos T <i>helper</i> o colaboradores
T _N	linfocitos T naíf
TREC	círculos de escisión del receptor del linfocito T
UI	unidades internacionales
V	voltio
vs	<i>versus</i>
w	pocillo

IV. INTRODUCCIÓN

IV. INTRODUCCIÓN

1. El sistema de complemento

El complemento, inicialmente denominado “alexina”, se identificó hace más de un siglo como un elemento termolábil del plasma humano que “complementaba” la acción bactericida y bacteriolítica de los anticuerpos.

Tradicionalmente considerado como elemento esencial de la inmunidad innata, el sistema de complemento está formado por un conjunto de más de 50 proteínas (Tabla I1) cuya activación en cascada conduce a la ejecución de sus tres funciones fisiológicas clásicas (Tabla I2): defensa innata frente a infecciones, como puente entre la inmunidad innata y adaptativa, y eliminando inmunocomplejos, así como células y cuerpos apoptóticos¹.

Tabla I1. Proteínas del sistema de complemento	
PRM	Función
C1q	Parte del complejo C1; reconoce IgG, IgM, CRP y PAMP; inicia la CP
MBL	Reconoce patrones de carbohidratos; inicia la LP
Ficolina H	Reconoce patrones de carbohidratos; inicia la LP
Ficolina L	Reconoce patrones de carbohidratos; inicia la LP
Ficolina M	Reconoce patrones de carbohidratos; inicia la LP
Properdina	Reconoce PAMP y DAMP; inicia la AP; estabiliza la convertasa de la AP
CRP	Reconoce DAMP y PAMP en células apoptóticas y microbianas; se une a C1q
CFHR-4	Recluta CRP monomérica hacia células necróticas; facilita la activación de la CP vía C1q
Proteasas	Función
C1r	Parte del complejo C1; corta C1s
C1s	Parte del complejo C1; corta C2 y C4
MASP-1	Se une a MBL/ficolinas; corta C2; puede cortar a MASP-2/3
MASP-2	Se une a MBL/ficolinas; corta C2 y C4
MASP-3	Desconocida (no se une a MBL/ficolinas; no corta C2 y C4)
C2	Forma parte de las convertasas en las CP y LP; escinde C3/C5
Factor B	Forma parte de las convertasas de C3/C5 de la AP; escinde C3/C5
Factor D	Corta al factor B unido a C3b para formar las convertasas de C3/C5 de la AP
Factor I	Inactiva a C3b y C4b
Componente	Función
C3	Progenitor de C3a, C3b, iC3b, C3dg y C3d; parte de las convertasas de C3/C5 de la AP
C4	Progenitor de C4a y C4b; forma parte de las convertasas de las CP y LP
C5	Progenitor de C5a y C5b/MAC
C6	Forma parte del MAC (inserción en membrana)
C7	Forma parte del MAC (inserción en membrana)
C8	Forma parte del MAC (inducción de la formación del poro)
C9	Forma parte del MAC (formación del poro lítico)
Receptores	Función
CR1/CD35	Se une a C3b/iC3b; induce fagocitosis; acelera la disociación de convertasas, cofactor de fI
CR2/CD21	Se une a C3b/iC3b/C3dg; disminuye el umbral de activación de linfocitos B
CR3/CD11b	Induce fagocitosis mediante interacción con iC3b; modula la familia de las IL-12 en APC

INTRODUCCIÓN

CR4/CD11c	Induce fagocitosis mediante interacción con iC3b
C3aR	Se une a C3a; desencadena señalización pro-inflamatoria
C5aR1/CD88	Se une a C5a; desencadena señalización pro-inflamatoria
C5aR2/C5L2	Se une a C5a/C5a ^{desArg} ; puede que se una a C3a/C3a ^{desArg} ; función poco definida
CR1g	Induce fagocitosis mediante interacción con iC3b/C3c; regula convertasas de C5
cC1qR	Reconoce a C1q unido; Induce señalización fagocítica a través de CD91
gC1qR	Reconoce a C1q; posible rol en fagocitosis y señalización; modula a Il-12 en APC
C1qRp	Parte del receptor del complejo que une C1q y media la fagocitosis

Reguladores	Función
-------------	---------

Solubles

C1-INH	Inhibe C1r/s y MASPs
MAp19	Se une a MBL, compite con MASPs
MAp44	Se une a MBL/ficolinas; inhibe la deposición de C4
Factor H	Reconoce las superficies propias; acelera la disociación de convertasas de AP; cofactor de fI
FHL-1	Acelera la disociación de convertasa de la AP; cofactor para fI
CFHR-1	Reconoce las superficies propias y a C5; inhibe el corte de C5 y la formación del MAC
CFHR-2	Acelera la disociación de convertasas de AP; compite con fH
CFHR-3	Compite con fH
CFHR-4	Acelera la disociación de convertasas de AP
CFHR-5	Compite con fH
Properdina	Reconoce PAMP y DAMP; inicia la AP; estabiliza la convertasa de la AP
C4BP	Acelera la disociación de convertasa de las CP y LP; cofactor para fI
Vitronectina	Se une a C5b-C9; previene el ensamblaje del MAC
Clusterina	Se une a C7-C9; previene el ensamblaje del MAC
Carboxipeptidasa-N	Degrada C3a y C5a en su formas desArg

Asociados a membrana y reguladores transmembrana

MCP/CD46	Cofactor para fI; rol en diferenciación y activación de linfocitos T
DAF/CD55	Acelera la disociación de convertasas
CD59	Se une a C8 y C9; previene el ensamblaje del MAC
CR1/CD35	Se une a C3b/iC3b; induce fagocitosis; acelera la disociación de convertasas, cofactor de fI

Adaptado de Ricklin *et al.*, 2010¹⁸ y de Bajic *et al.*, 2015⁷. PRM, pattern-recognition molecule; CRP, C-reactive protein; MASP, MBL-associated serine proteases; MBL, mannose-binding lectin; CP, vía clásica; LP, vía de las lectinas; AP, vía alternativa; MAC, membrane attack complex; CR1-4, complement receptor 1-4; fI, factor I; fH, factor H; APC, antigen-presenting cells; CFHR-1-5, complement factor H-related proteins 1-5; MCP, membrane cofactor protein; DAF, decay acceleration factor.

Sin embargo, en los últimos años se han postulado mecanismos de activación de algunas proteínas del complemento diferentes a los clásicos, con funciones más bien propias de la inmunidad adaptativa que de la innata. En este contexto, surge la necesidad de diferenciar entre los mecanismos de activación tradicionales, que tienen lugar fundamentalmente en el plasma y en algunos tejidos —activación extracelular—, de estos nuevos mecanismos que ocurren intracelularmente —activación intracelular— y que demuestran tener especial importancia en la biología de los linfocitos T y presumiblemente de todos los leucocitos.

Tabla I2. Funciones clásicas del sistema de complemento

Función	Actividad	Proteína responsable
Defensa frente a infecciones	Opsonización de antígenos	Fragmentos derivados de C3 y C4
	Quimiotaxis y activación leucocitaria	Anafilotoxinas (C5a, C3a y C4a) y sus receptores sobre leucocitos
	Lisis bacteriana y de células dañadas	Complejo de ataque a membrana (C5b-C9)
Puente entre inmunidad innata y adaptativa	Aumento de la respuesta de anticuerpos	Fragmentos derivados de C3 (y C4), receptores de C3 en linfocitos B y células presentadoras de antígeno.
	Potenciación de la memoria inmunológica	Fragmentos derivados de C3 (y C4), receptores de C3 en linfocitos B y células dendríticas foliculares.
Eliminación de residuos	Eliminación de inmunocomplejos	C1q y fragmentos derivados de C3 y C4
	Eliminación de productos apoptóticos	

Adaptado de Walport, 2001¹.

1.1.Activación extracelular

El complemento es un potente sistema efector cuya activación da lugar a una serie de interacciones proteolíticas y de proteína-proteína que resultan en la opsonización de los patógenos invasores y de inmunocomplejos, en el reclutamiento de leucocitos al sitio del daño o de la infección, y/o en la lisis del patógeno en cuestión².

La cascada de activación del sistema de complemento puede iniciarse a través de tres rutas o vías: la vía clásica (*Classical Pathway*, CP), la vía de las lectinas (*Lectin Pathway*, LP) y la vía alternativa (*Alternative Pathway*, AP) (figura I1.1). La activación a través de cualquiera de las tres vía da lugar a su vez a la activación proteolítica de la proteína C3, bien por la convertasa de la vía clásica (C4bC2b) mediante activación a través de la CP o de la LP, o bien a través de la convertasa de la vía alternativa (C3bBb). Como resultado de la escisión de C3 se generarán los fragmentos C3a (anafilotoxina) y C3b (opsonina). Este último expone un grupo tioéster que puede unirse covalentemente a grupos amino e hidroxilo de las superficies celulares. C3b forma parte también de la propia convertasa de C3 de la AP, que escindirán a más proteínas C3, amplificándose la generación de C3b y aumentando la cantidad de C3b disponible para depositarse sobre superficies celulares. La acumulación de moléculas no inactivadas de C3b da lugar a la formación de las convertasas de C5 (la convertasa de C5 de la CP o C4bC2bC3b y la convertasa de C5 de la AP o C3bBbC3b), que activarán proteolíticamente al C5 en C5a (anafilotoxina) y C5b, iniciando así la vía lítica terminal. Los fragmentos de C5b se unen posteriormente a otros componentes de la cascada de activación (C6, C7, C8, C9) para formar el complejo de ataque a membrana (MAC), que producirá poros en la superficie celular del patógeno y la consiguiente lisis de la célula.

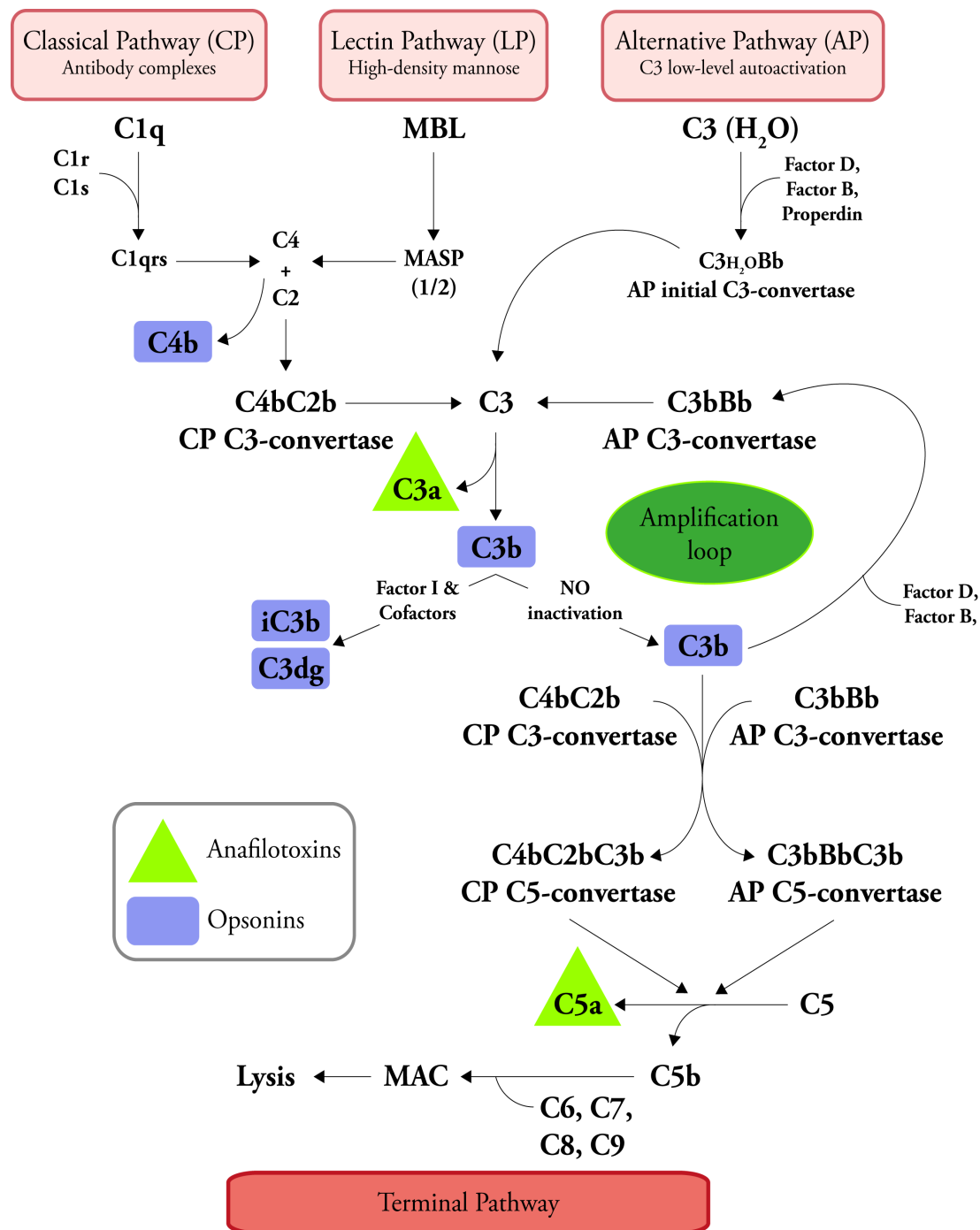


Figure II.1. Schematic representation of the complement cascade. MBL, mannose-binding lectin; MASP, MBL-associated serine proteases; MAC, membrane attack complex.

1.1.1.Vía clásica

La CP se activa cuando el C1q hexamérico, una molécula de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition molecule*, PRM), como parte del complejo C1qrs que contiene dos moléculas de la proteasa C1r y dos moléculas de la proteasa C1s^{3, 4}, se une a la región Fc de las inmunoglobulinas IgG (concretamente IgG₃ e IgG₁) o IgM⁵. Esta activación se vuelve óptima como consecuencia de una organización hexámerica

de anticuerpos unidos a antígenos; esta configuración da lugar a un aumento 20 veces mayor de la avidéz de C1q por la región Fc⁶ (. Además de anticuerpos unidos a sus dianas, C1q también reconoce diferentes estructuras directamente sobre la superficie de células microbianas o apoptóticas o a través de PRM endógenas como la proteína C reactiva, la pentraxina-3, el componente sérico P amiloide y fibrillas de β -amiloide^{7,8}. Los cambios estructurales que se producen por la unión de C1q a su ligando inducen la auto-activación de C1r, y ésta a su vez, la activación de C1s⁹ que produce la ruptura de C4 en C4a y C4b, y posteriormente, de C2 en C2a y C2b. C4b puede unirse covalentemente a microbios, inmunocomplejos o restos celulares (opsonización) mediante un enlace tioéster, reclutar a C2b y formar la convertasa de C3 de la CP (C4bC2b), que escindirá a la proteína C3 iniciando la amplificación y las funciones efectoras del sistema.

1.1.2.Vía de las lectinas

Al igual que la CP se desencadena cuando C1q se une a su ligando, la LP se activa por unión de una serie de moléculas a los suyos¹⁰. Éstas pueden ser lectinas de unión a manosa (MBL), colectinas, así como ficolinas H, L y M¹¹⁻¹³, que contienen dominios de reconocimiento a carbohidratos que raramente se encuentran en la superficie de las células propias. En cambio, sí están presentes frecuentemente en bacterias, virus y células apoptóticas. Paralelamente a como ocurre en la CP con la unión de C1q a C1r y C1s, las MBL se unen a serín proteasas, denominadas serín proteasas asociadas a MBL (MASP) posibilitándose a la escisión de C4 y C2¹⁴ para formar la convertasa CP/LP C4bC2b, que actuará sobre C3.

1.1.3.Vía alternativa

Generalmente, la AP se encuentra activada de forma constitutiva (“tick-over”) como consecuencia de la lisis espontánea de C3. Esta lisis expone un grupo tioéster que se asocia con una molécula de agua al C3, dando lugar a C3(H₂O), que a su vez recluta a las serín proteasas actor D (fD) y factor B (fB)⁵. El fD escinde al B en los fragmentos Ba y Bb, de manera que la porción catalítica Bb se une a C3(H₂O), generando la convertasa de C3 inicial de la AP (C3H₂OBb), que es capaz de hidrolizar C3 para producir C3b^{15,16}. La unión de estos fragmentos de C3b generados por la convertasa inicial al fB plasmático y la activación por fD da lugar a la formación de la convertasa de C3 de la AP (C3bBb) que escinde C3 en C3a y C3b. La convertasa de la AP junto con las convertasas generadas por las otras dos vías, da lugar a la formación de más fragmentos C3b y a la formación de un bucle de retroalimentación que amplifica la respuesta¹⁷.

Además de formar parte de nuevas convertasas, los fragmentos de C3b se pueden unir covalentemente a las dianas relevantes (microbios, inmunocomplejos, células apoptóticas), y su actividad opsonina puede regularse mediante proteínas reguladoras que actúan como cofactores de la proteasa factor I, lo que da lugar a las opsoninas iC3b y C3dg, incapaces de formar nuevas convertasas (fig I1). La amplificación de la activación de la AP aumenta la densidad de los fragmentos de C3b depositados permitiendo la formación gradual de las convertasas que contienen moléculas adicionales de C3b —convertasas de C5— (C4bC2bC3b y C3bBbC3b) y pasando a ser el sustrato de la especificidad C5 en vez de C3¹⁸.

Las convertasas iniciales de C3 de la AP son muy inestables ($C3H_2OBb$), pero su rápida disociación se ve compensada por la properdina, que estabiliza los complejos de convertasas de C3 al unirse directamente a ellos ($C3bBbP^{19-21}$).

La AP, al contrario de la CP y la LP, carece de una molécula iniciadora como tal que reconozca una diana de activación de la propia vía, aunque determinadas moléculas como properdina y P-selectina pueden actuar como PRM, reclutando $C3(H_2O)$ y $C3b$ a la diana y ejercer como iniciadores locales de la AP²². Cuando la properdina actúa como PRM es capaz de reconocer varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o al daño (DAMPs) sobre células no propias o apoptóticas¹⁸. Cuando se ha unido a ellos, se inicia y propaga la activación del complemento mediante el reclutamiento del $C3b$ de la fase fluida a las superficies reconocidas²³ y dando lugar al ensamblaje *de novo* de la convertasa de C3 de la AP.

1.1.4. Amplificación y vía lítica terminal

Aunque todas las convertasas de C3 unidas a las superficies celulares, tanto de las CP/LP como de la AP, pueden inducir la amplificación de la AP por la activación de C3, lo cierto es que la AP representa hasta el 80-90% del total de la activación del complemento, incluso cuando el inicio de la cascada se ha producido a través de la CP o de la LP²⁴.

El cambio de afinidad de C3 hacia C5 da lugar al cese de la opsonización por parte de $C3b$ y al inicio del daño en la membrana inducido por el MAC que forma parte de la vía lítica terminal. Las convertasas de C5 ($C4bC2bC3b$ y $C3bBbC3b$) actúan proteolíticamente sobre C5, generando C5a, una potente anafilotoxina, y C5b. Cuando C5b se une a los componentes C6 y C7 el complejo comienza a insertarse en las membranas celulares. En este punto, interacciona con C8 induciendo la unión a su vez de varias moléculas de C9, que finalmente conformarán un poro lítico que dará lugar a la lisis de la célula²⁵.

1.1.5. Regulación de la activación extracelular del sistema de complemento

Tras detectar las señales de daño o peligro, el sistema de complemento es capaz de responder a ellas directamente, provocando la lisis de la célula patógena, o indirectamente mediante la activación de respuestas inmunes celulares innatas y adaptativas a través de varios receptores de complemento^{26, 27}.

Sin embargo, la alta eficiencia de este sistema para etiquetar e inducir la destrucción de patógenos hace necesaria la presencia de mecanismos de regulación que eviten que su activación excesiva o inespecífica provoque daños en las células y tejidos propios (fig. I1.2).

Por ello, es imprescindible que exista un balance correcto entre activación e inhibición de las proteínas del complemento (fig. I1.3) diseñado para prevenir (i) una activación excesiva en una diana aunque sea la adecuado, (ii) una activación en fase fluida sin la presencia de la diana y (iii) una activación sobre dianas inadecuadas como las células sanas propias²⁸. Esta estrecha regulación se lleva a cabo por proteínas reguladoras que actúan en fase soluble (solubles) o unidas a membrana²⁹⁻³² (Tabla I1).

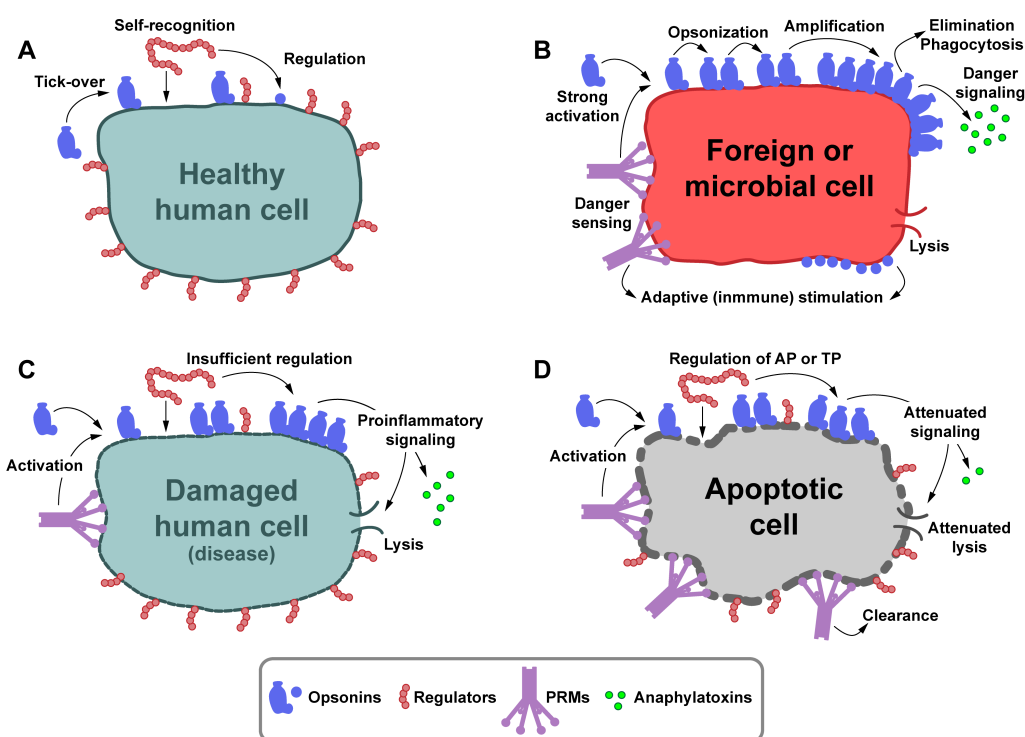


Figure 11.2. Complement functions. **A.** Tick-over ensures occasional probing of healthy human cells; the presence of surface-bound regulators and self-recognition by regulators prevents any amplification. **B.** When a microbial cell appears, a strong complement activation is induced by PRMs and amplified in the absence of regulators. **C.** Any imbalance in complement activation/regulation leads to an attack on host cells and trigger immune and inflammatory diseases. **D.** PRMs also recognize the surfaces of apoptotic cells, but the presence of efficient regulation facilitates the elimination of the cell without triggering danger signals and further immune responses. Adapted from Ricklin *et al.*, 2010¹⁸.

La regulación del complemento comienza en los primeros pasos de activación mediante el control del reconocimiento de las diferentes moléculas y sus proteasas asociadas.

Dentro de los reguladores solubles se incluyen al C1 inhibidor (C1-INH³³), que inactiva a C1r, C1s y MASP-1/2, pero también actúa sobre serín proteasas no pertenecientes al complemento^{22, 34}, a los productos del corte de MASPs —MAp19 y MAp44— (ver Tabla I1) que carecen de los dominios proteasa de las MASPs y que compiten con MASPs por la unión a MBLs, ficolinas y colectinas¹¹, a la carboxipeptidasa-N, que inactiva (parcialmente) a C3a y C5a en sus formas desArg³⁵, a *FH-like protein* (FHL-1^{36, 37}), a la proteína activadora properdina (o factor P³⁸), a la vitronectina³⁹ y a la clusterina⁴⁰, además de a otros reguladores descritos más recientemente, como las proteínas relacionadas con factor H (*complement factor H-related*, CFHR-1-5⁴¹).

El control del ensamblaje de las convertasas de C3 y de C5 se lleva a cabo por un conjunto de reguladores situados en el cromosoma 1q32, genética, estructural y funcionalmente relacionados, que reciben el nombre de reguladores de la activación de complemento^{42, 43} (RCA). Estas proteínas modulares están formadas por dominios CCP (*complement control proteins*), también llamados dominios Sushi o *Short Consensus*

Dentro del RCA se encuentran reguladores que actúan en fase fluida, como factor $H^{44, 45}$ (fH) y *C4b-binding protein*⁴⁶ (C4BP), o los miembros del RCA que ejercen su actividad unidos a membrana⁴⁷, como el receptores de complemento 1 (CR1/CD35⁴⁸), la proteína cofactora de membrana (MCP^{42, 49-51}) y el factor de aceleración de la disociación (DAF)^{52, 53}.



Figure I1.3. Activation and regulation of the complement system. MBL, mannose-binding lectin; MASP, MBL-associated serine proteases; MAC, membrane attack complex; C4BP, C4b-binding protein; MCP, membrane cofactor protein; CR1, complement receptor 1; DAF, decay-accelerating factor.

1.2.Activación intracelular

La mayor parte de las proteínas circulantes del complemento son producidas por el hígado, aunque la biosíntesis de complemento extra-hepática puede darse también en otros tipos celulares diferentes de hepatocitos como fibroblastos, linfocitos T y B, adipocitos y células endoteliales⁵⁵ (revisado en Jiménez-Reinoso *et al.*⁵⁶). La proteína C3, cuya secreción constitutiva viene dada mayoritariamente por hepatocitos, también puede ser secretada en pequeñas cantidades o aumentada su expresión por otras células como parte de una respuesta de fase aguda⁵⁷.

Hace casi 30 años se describió que los linfocitos T activados con el mitógeno PHA y las líneas transformadas con el virus linfotrópico de células T humanas tipo I o HTLV-I sintetizaban y secretaban C3⁵⁸.

Sin embargo, en los últimos años han visto la luz publicaciones que demostraban efectivamente una síntesis intracelular de componentes del complemento, especialmente fragmentos de C3 o derivados, poniendo de manifiesto la existencia de otro sistema de activación del complemento diferente al tradicional extracelular. Se ha visto que tras activar linfocitos T a través de su receptor (TCR), éstos eran capaces de producir C3, de forma que el fragmento que mayoritariamente se detectaba unido a la superficie del propio linfocito tras la activación era iC3b⁵⁹.

Inesperadamente, se ha descrito que es una proteasa, la catepsina L (CTSL) la enzima encargada de escindir intracelularmente a C3 en sus fragmentos habituales C3a y C3b, y no una convertasa convencional plasmática⁶⁰ y que precisamente la activación intracelular de C3 por parte de esta proteasa tiene importantes consecuencias sobre la supervivencia y función efectora de los linfocitos T CD4⁺. Esta proteasa la localizaban en el retículo endoplásmico, en endosomas tardíos derivados de retículo y en lisosomas⁶¹, mientras que C3 lo detectaban también en retículo endoplásmico y endosomas tardíos, pero además en endosomas tempranos (fig. I1.4), por tanto tenían localizaciones comunes. En condiciones de reposo, la activación “tónica” de C3 por CTSL para generar C3a en vesículas endo/lisomales, y la posterior unión de este fragmento a su receptor C3aR en lisosomas era esencial para garantizar la homeostasis del linfocito T CD4⁺ vía mTOR⁶⁰. Es más, la activación vía TCR y MCP/CD46 del linfocito T daba lugar a una translocación del sistema a la membrana, donde los fragmentos C3a y C3b generados intracelularmente en dichas vesículas se unían a sus respectivos receptores —C3aR y MCP/CD46— situados en la membrana del linfocito, lo que permitía la inducción completa de respuesta Th1⁶⁰ (fig. I1.5). Por ello, se postula que la activación de C3 intracelular y su señalización autocrina juegan un papel fundamental en la inducción y modulación de la función T, y posiblemente de otros tipos celulares dado que esta activación tónica intracelular de C3 también se ha visto en otras células de estirpe mieloide y no mieloide^{62, 63}.

Recientemente se ha descrito que este sistema también puede ser funcional en células

apoptóticas, las cuales internalizan fH para potenciar la escisión intracelular mediada por CTSL incrementando así la opsonización por iC3b en la superficie⁶⁴.

Frente a los hallazgos de síntesis intracelular de C3 de 2013, a principios de este año se ha caracterizado un nuevo sistema que sin negar la síntesis intracelular, implica acumulación de C3 dentro de la célula —concretamente de su forma hidrolizada funcionalmente análoga a C3b, C3(H₂O)— como consecuencia de una vía de reciclaje que actuaría internalizando C3(H₂O) endocíticamente⁶⁵ (fig. I1.4), lo que pone de manifiesto que aún se desconocen los diferentes mecanismos por los cuales se acumula C3 intracelular⁶⁶.

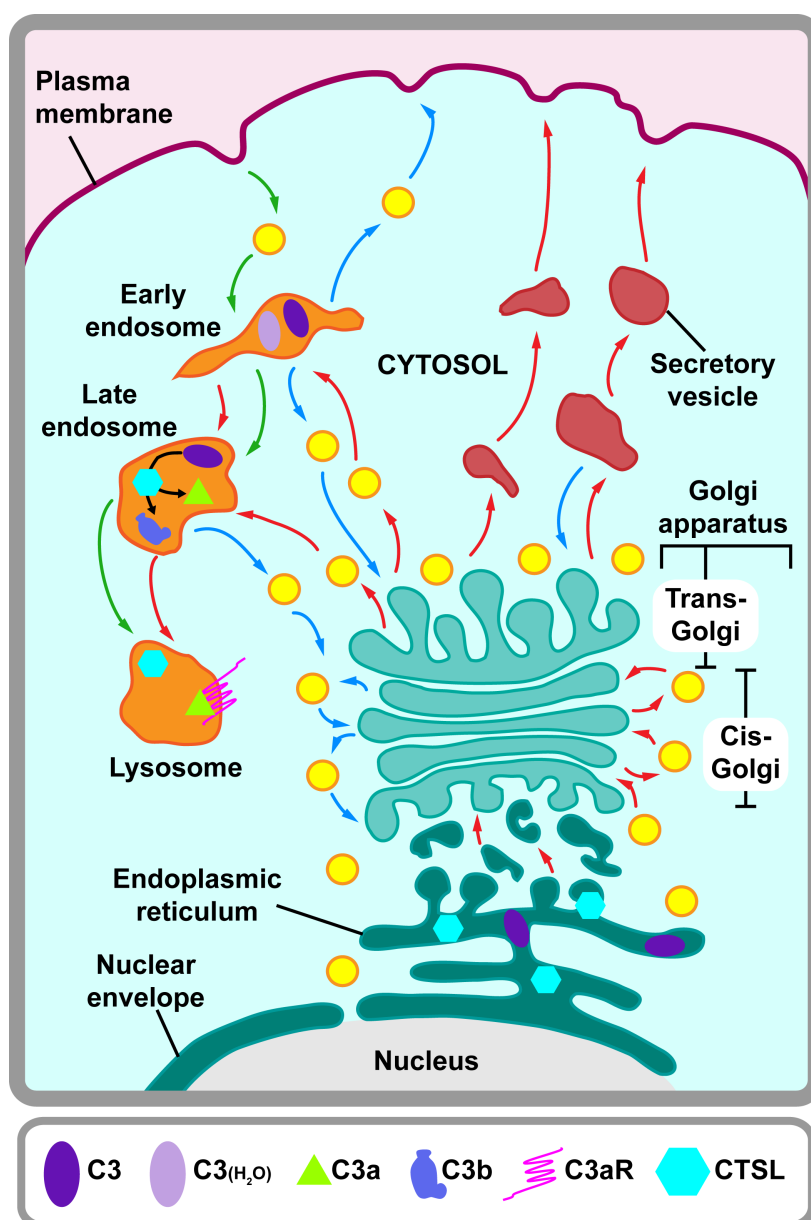


Figure I1.4. Subcellular complement localizations along vesicular trafficking. Red arrows identify biosynthetic-secretory pathways; blue arrows denote retrieval/recycling pathways; green arrows identify endocytic pathways. C3aR, C3a receptor; CTSL, cathepsin-L. Based on findings from Liszewski *et al.*, 2013⁶⁰ and Elvington *et al.*, 2017⁶⁵.

La identificación de un sistema de activación intracelular de la proteína C3 ha supuesto un cambio sobre la visión clásica de activación del complemento. Pero los nuevos hallazgos de los últimos años no conciernen sólo a C3. Muy recientemente se ha descrito un sistema similar de activación intracelular de la proteína C5⁶⁷. Este estudio señala la importancia de los receptores de C5, C5aR1 (CD88) y de C5aR2 (C5L2) en la inducción y ensamblaje de un inflamasoma NLRP3 en linfocitos T⁶⁸. Tras activación del linfocito T CD4⁺ vía TCR y co-activación de MCP/CD46 se producía la escisión intracelular de C5, de forma que la unión del fragmento derivado C5a a su receptor C5aR1 proveía de señales para la generación de un inflamasoma NLRP3, que promovía la secreción de interleucina-1 β que resultaba en la producción de interferón- γ (IFN- γ) y en la inducción autocrina de respuesta Th1. Curiosamente, así como C5aR1 actuaba como activador del sistema, el otro receptor, C5aR2 —restringido a la membrana del linfocito— actuaba como inhibidor del sistema (fig. I1.5), promoviendo la síntesis de IL-10 y la desviación hacia un fenotipo T regulador (contracción Th1). Aunque la proteasa responsable de la escisión de C5 aún no ha sido caracterizada, estos hallazgos, junto con los de la activación intracelular de C3, ponen de manifiesto el importante papel que juega el complemento local e intracelular en la biología T, y señalan el camino para el establecimiento de mecanismos de regulación intracelular diferentes a los plasmáticos.

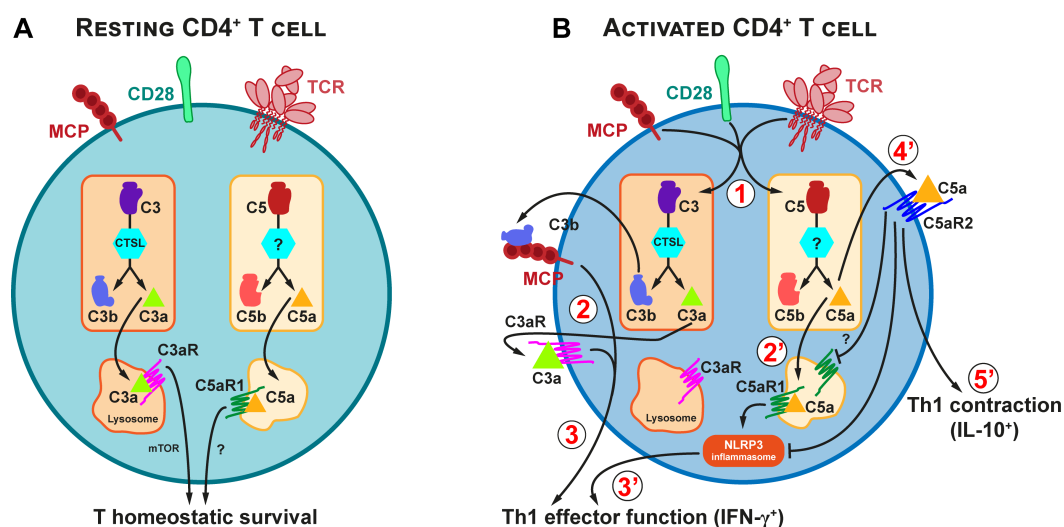


Figure I1.5. Intracellular C3 and C5 activation according to Liszewski *et al.*, 2013⁶⁰ and Arbore *et al.*, 2016⁶⁸. **A.** Resting CD4⁺ T cells contain intracellular C3 and C5 stores which undergo proteolytic cleavage by cathepsin-L and an undefined protease, respectively. “Tonic” lysosomal C3a/C3aR engagement sustains T cell homeostatic survival; the mechanism for C5a is likely similar but as yet undefined. **B.** After MCP+TCR- or CD28+TCR-activation (1), intracellular C3a and C3b translocate to the cell membrane (2), where their engagement to C3aR and MCP, respectively, promotes Th1 effector function (3). In parallel (2’), intracellular C5a binding to C5aR1 induces NLRP3 inflammasome assembly, which promotes Th1 effector functions (3’). A Th1 contraction response (5) may ensue by extracellular C5a binding to C5aR2 (4’) in the cell membrane.

Sin embargo, quedan por resolver importantes cuestiones que incluyen la identificación de otras proteasas específicas de otros tipos celulares, la caracterización de la regulación y desregulación del sistema, la identificación de otros posibles fragmentos derivados de C3 que participen en el mecanismo (iC3b, C3dg, etc.) y la posible aplicación de estos hallazgos a una nueva dimensión terapéutica que actúe sobre la activación intracelular de complemento⁶⁶.

2. Papel del complemento en la diferenciación y función de linfocitos T

2.1. Diferenciación de linfocitos T

Los precursores de los linfocitos T se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, desde donde migran al timo para madurar hasta convertirse en linfocitos T. Tras diferentes pasos de diferenciación que incluyen selección positiva y negativa, los linfocitos T salen del timo hacia la periferia, y lo hacen como linfocitos T naíf (T_N) maduros, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$, específicos frente a un epítipo concreto⁶⁹. Al encontrarse con dicho epítipo, los linfocitos T_N se activan y responden proliferando y diferenciándose a células efectoras y de memoria^{70, 71}. Los linfocitos T_N $CD4^+$ además son capaces de diferenciarse en diferentes subtipos efectoras en donde se incluyen los linfocitos T colaboradores o *helper* (Th): Th1, Th2, Th9, Th17, Th22^{71, 72}, así como los Th foliculares⁷³ (Tfh) y los T reguladores inducidos⁷⁴ (iTreg), cada uno de los cuales está especializado en una función concreta y adaptado para contrarrestar a un patógeno específico⁷⁵ o a una activación excesiva del sistema inmunitario.

Los linfocitos T pueden subdividirse en función de la expresión de ciertos marcadores de superficie como CD45RA y CD45RO, que son variantes de *splicing* del gen *CD45*^{76, 77}. CD45RO se expresa preferencialmente en las células de memoria^{78, 79}, y aquellas células $CD45RO^+$ se encuentran en baja proporción en los neonatos⁸⁰ y con la edad se van acumulando progresivamente⁸¹.

Los linfocitos T_N $CD4^+$ humanos se caracterizan por expresar los marcadores CD45RA, CD62L, CD27, CD28 y CCR7, y por no expresar otros como CD45RO, CD11a, CD44, CD95, CXCR3 y CCR4^{82, 83}. Más recientemente se ha descrito un marcador⁸⁴ (CD31 o PECAM-1) que diferencia a los linfocitos T_N $CD4^+$ que se expanden en la periferia ($CD31^-$, *central naïve* o CN) de los recién salidos del timo ($CD31^+$, *thymic naïve* o emigrantes recientes tímicos, RTE), que tienen una elevada expresión de círculos de escisión del receptor del linfocito T⁸⁵⁻⁸⁸ (TREC). Por tanto, CD31, CD4 y CD45RA permiten distinguir a los T_N $CD4^+$ RTE de los CN (fig. I2.1).

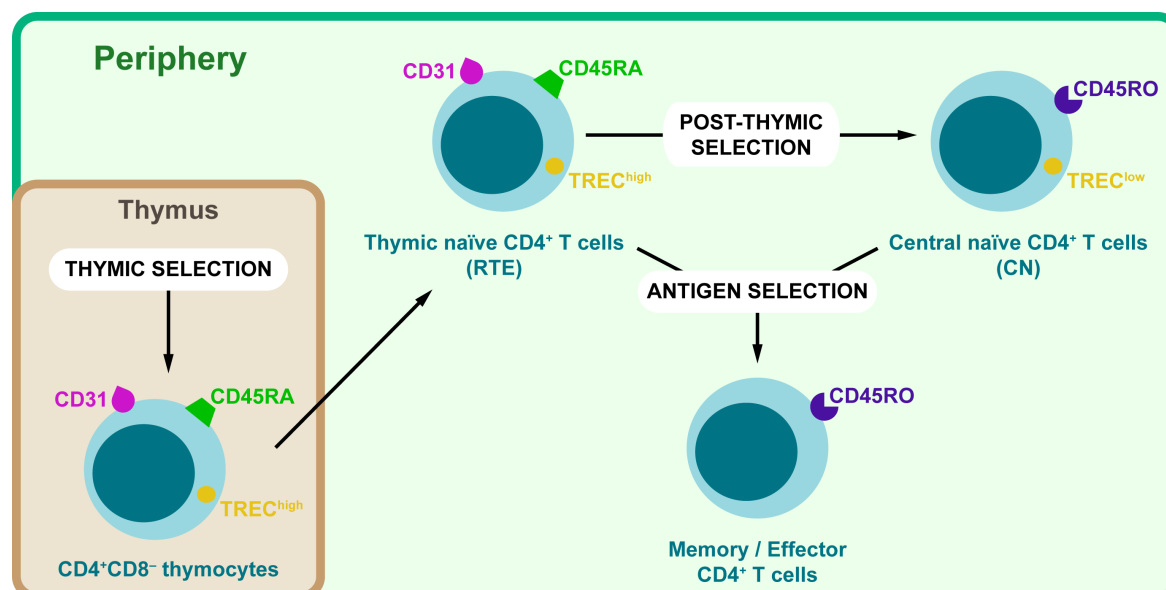


Figure I2.1. Post-thymic proliferation of human T_N $CD4^+$ cells. RTE emigrate ($TREC^{high}$) from the thymus to the periphery. After post-thymic selection, T_N $CD4^+$ CN ($TREC^{low}$) are induced to maintain the T_N $CD4^+$ pool. When both cell types interact with a cognate antigen, they differentiate into memory / effector $CD4^+$ cells. T_N , naïve T cells; TREC; T cell receptor excision circles; RTE, recent thymic emigrants; CN, central naïve. Adapted from Kohler *et al.*, 2009⁸⁸.

En cuanto a los linfocitos T de memoria, existe una gran heterogeneidad tanto a nivel de la expresión de sus receptores en superficie, como de su función efectora, localización y propiedades de tráfico celular^{89, 90}, y al menos se han descrito cuatro subtipos⁷¹: (i) memoria centrales (*central memory*, T_{CM}), (ii) memoria efectoras (*effector memory*, T_{EM}); (iii) memoria residentes en tejido (*tissue-resident memory*, T_{RM}) y (iv) memoria progenitoras (*stem memory*, T_{SCM}).

2.2. Participación del complemento en la diferenciación y en la función T

El sistema de complemento es capaz de polarizar linfocitos T y participa en las fases de inducción, efectora y de contracción de las respuestas T^{91-93} . De hecho, estudios en ratón⁹⁴ muestran que la producción local de C3a y de C5a y la unión a sus respectivos receptores situados en los linfocitos T da lugar a la producción de citocinas (interleucina-12 o IL-12, IFN- γ) por parte de estas células, favoreciendo el mantenimiento y supervivencia de los linfocitos T_N $CD4^+$. En este contexto, también se ha descrito que la ausencia autocrina de señalización C3aR/C5aR en los linfocitos T da lugar a la elevación del factor de crecimiento tumoral- $\beta 1$ o TGF- $\beta 1$ y a la inducción de iTreg Foxp3⁺^{95, 96}.

Además de las anafilotoxinas y sus receptores, otras de las moléculas de complemento cuya actividad se relaciona cada vez más y más directamente con la biología T es el regulador MCP/CD46 —proteína que se expresa en casi todos los leucocitos humanos, pero no de ratón—, y más concretamente su isoforma con el dominio intracelular CYT-1. La co-activación del TCR y de CD46 por unión de sus ligandos en presencia de cantidades crecientes de IL-2 da lugar a un cambio de fenotipo inflamatorio Th1, con producción de IFN- γ , hacia uno regulador, con producción de IL-10^{97, 98}. En línea con este hallazgo, se ha visto que la proteína de la familia Notch Jagged-1 puede regular la inducción de respuesta Th1 en linfocitos T $CD4^+$ al actuar como un tercer ligando fisiológico de CD46⁹⁹.

Estudios recientes han empezado a desentrañar otro papel del complemento en relación con el metabolismo de los linfocitos T. Antes de activarse, los linfocitos T_N $CD4^+$ son metabólicamente quiescentes. Para poder proliferar y diferenciarse, deben sufrir una reprogramación que implica la incorporación de nutrientes y el uso de vías metabólicas. La estimulación autocrina de CD46 mediante la unión de su ligando C3b —generado intracelularmente en un sistema in vitro sin C3 extracelular, ver apartado 1.2 de esta Introducción— da lugar a la inducción de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa necesarias para la inducción de respuesta Th1¹⁰⁰.

El regulador DAF/CD55, que en plasma actúa disociando las convertasas al unirse a C3b y C4b, también desempeña un papel en el establecimiento de la respuesta inmunitaria. Además de controlar la activación del complemento, los experimentos en ratones deficientes en DAF revelan que éstos presentan una respuesta Th1 exacerbada con

una hipersecreción de IFN- γ ^{101, 102}, que podría explicarse como una reacción exagerada a la producción de anafilotoxinas¹⁰³.

Recientemente, se ha demostrado que también CD59 es capaz de regular a los linfocitos T al modular la activación de los mismos mediante la transmisión de señales a través de Lck al TCR/ ζ ¹⁰⁴. También se ha descrito que la activación de CR1 por unión de sus ligandos (Tabla I1) en linfocitos T reduce la tasa de proliferación y secreción de IL-2¹⁰⁵ de los mismos. Además, dado el papel de MCP/CD46 sobre linfocitos T activados, la reducción de la expresión de CD46 puede dar lugar a una sobre-activación local de complemento, generándose grandes cantidades de fragmento C3b, iC3b y de C5b-9. Por ello, la unión de C3b e iC3b, y de C5b-9 a CD59 podría contribuir a la regulación negativa que controla la expansión de respuesta Th1¹⁰⁶.

Además de reguladores de membrana que actúan de forma intrínseca sobre los linfocitos T, también se ha visto que la función T puede estar modulada por C1q y fragmentos unidos a membrana derivados de C3, como opsoninas¹⁰⁷. La unión de C1q a linfocitos T humanos o la opsonización de inmunocomplejos puede influir en la activación de los linfocitos T, su proliferación y su producción de citocinas, bien de forma directa, o bien indirectamente incrementando la función de presentación antigénica por parte de células dendríticas y macrófagos¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Los depósitos de fragmentos activos de C3 (C3b/iC3b/C3dg) sobre las superficies celulares (opsonización) de células dendríticas y macrófagos también puede regular la función de presentación antigénica y potenciar la interacción linfocitos T-célula presentadora de antígeno¹¹¹ (APC; fig. I2.2).

2.3.Regulación de los linfocitos T mediada por las DC y el complemento

El complemento también puede ejercer su función sobre los linfocitos T a través de la modulación de las APC y más concretamente, mediante células dendríticas (DC).

Tanto monocitos, células dendríticas, así como las DC derivadas de monocitos (MDDC) expresan una amplia gama de CR y reguladores de superficie⁵⁶, y son capaces de producir proteínas solubles de complemento de las tres vías de activación del complemento, entre ellas C1q, C3 y C5^{101, 112-114}, además de fB y fD^{94, 115, 116}. La síntesis local de C3 por DC es esencial para inducir la activación del linfocito T y generar una correcta respuesta Th1¹¹⁷. Las DC derivadas de médula ósea de ratones *knock-out* para C3 presentan una menor expresión de HLA-DR, CD86 y de IL-12 tras inducción con lipopolisacáridos, y tienen una menor capacidad de estimular la proliferación alo-reactiva de linfocitos T CD4⁺ con la consiguiente síntesis de citocinas Th1 como IFN- γ . La unión cognada linfocito T-DC genera la síntesis local de anafilotoxinas, que tras unirse a sus receptores respectivos (C3aR y C5aR1) de forma autocrina, da lugar a la potenciación de respuestas efectoras^{114, 118, 119}. De forma análoga, en la deficiencia de C3¹²⁰, los monocitos muestran un defecto de la generación *in vitro* de células mieloides (mDC, que se corresponden con las MDDC), con una menor frecuencia de las MDDC diferenciadas, una expresión menor de CD1a y de HLA-DR, una menor síntesis de IL-12p70 inducida por LPS y una menor capacidad para alo-estimular a linfocitos T CD4⁺. Curiosamente, también se ha visto que los linfocitos B y macrófagos pueden liberar fragmentos de C3 en forma de exosomas que se depositan en su membrana; si estas APC contienen el antígeno cargado, los exosomas depositados en su membrana pueden inducir una respuesta T

significativamente más alta cuando el estímulo antigénico no es muy abundante¹²¹. En conjunto, estos estudios indican la importancia que tienen los CR y sus ligandos como componentes regulatorios del compromiso y supervivencia T (fig. I2.2).

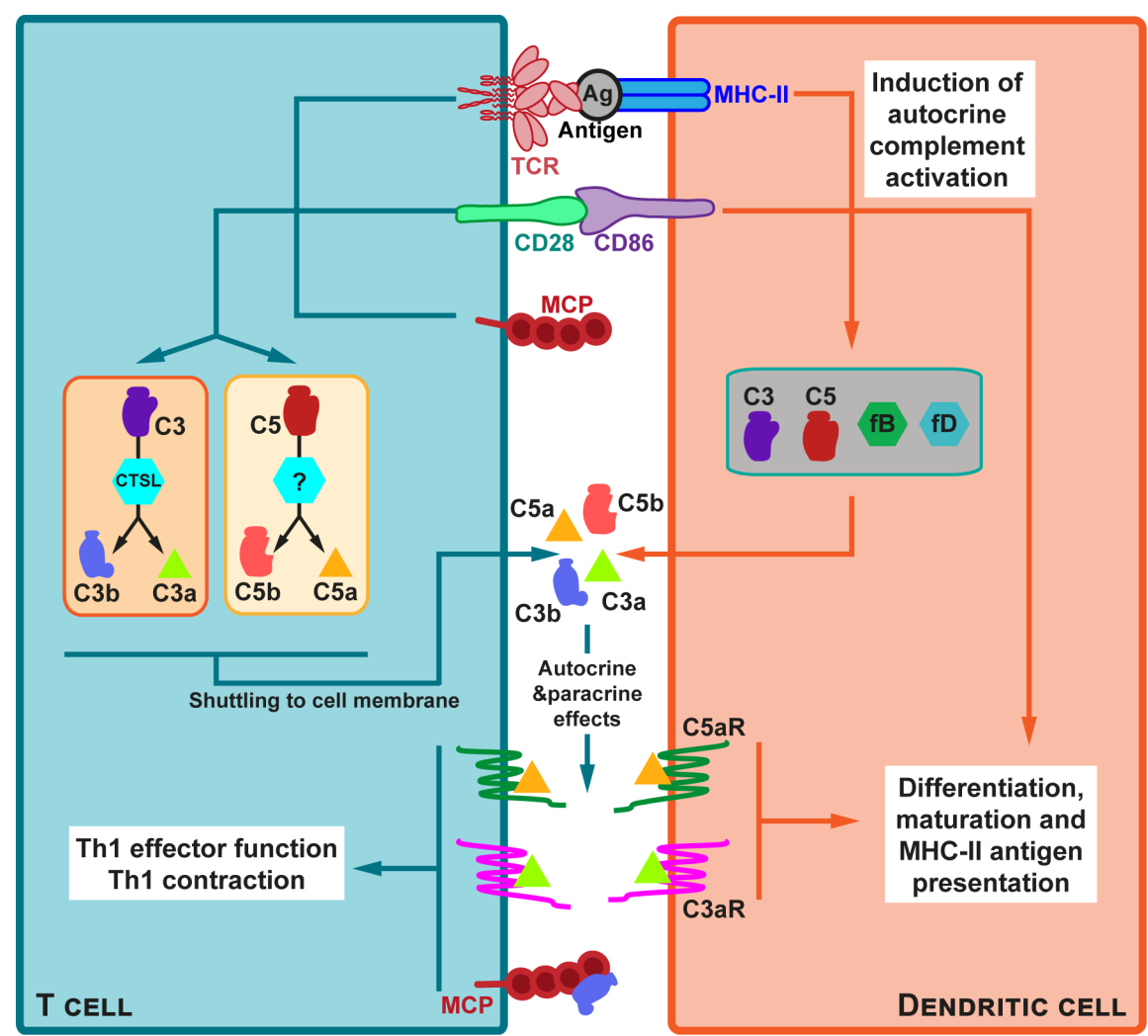


Figure I2.2. Complement-mediated T cell regulation. Cognate T-DC ligation promotes synthesis and secretion of complement components such as C3/C3a/C3b, C5/C5a/C5b, fB and fD. At the extracellular space, they can form C3/C5 convertasas leading to C3 and C5 extracellular cleavage in parallel with “tonic” C3a/C5a fragments intracellularly generated. After activation, autocrine and paracrine C3a and C5a binding to their receptors in the cell membranes (C3aR and C5aR1/2) promotes Th1 effector/contraction functions as well as DC differentiation, maturation and MHC-II antigen presentation. Adapted from Kolev *et al.*, 2014⁶².

3. Papel del complemento en la diferenciación y función de linfocitos B

3.1. Diferenciación de linfocitos B

El desarrollo y diferenciación de los linfocitos B tiene lugar en dos etapas que ocurren en diferentes tejidos: (i) la diferenciación de precursores B a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea hacia linfocitos B naïf maduros¹²², y (ii) la maduración hacia células memoria y efectoras en los órganos linfoides secundarios^{123, 124}.

Los linfocitos B naïf maduros expresan moléculas tanto IgM como IgG, recirculan por los diferentes tejidos y constituyen cerca del 50% de los linfocitos B totales en un individuo adulto¹²⁵. Como presentan múltiples segmentos de genes V, D y J disponibles para la recombinación V(D)J unido a la variabilidad adicional que se genera en los sitios de unión, cada nuevo linfocito B naïf que se genera contiene un receptor de linfocito B (BCR) único que en sí mismo representa un marcador clonal^{126, 127}.

La activación del linfocito B se inicia tras la unión de un antígeno específico al receptor del linfocito B (BCR) de una forma que puede ser Th-independiente o Th-dependiente¹²⁸. En este último caso, los linfocitos B activados por el antígeno y los linfocitos Th migran hacia los límites del folículo B y los límites de la zona T del órgano linfoides secundario, respectivamente, lo que permite que establezcan una interacción B-T estable que le permite al B recibir las señales colaboradoras de los Th (fig. I3.1, A). En esta activación B T-dependiente, los últimos hallazgos apuntan a que los linfocitos B una vez activados por la unión del antígeno comienzan a proliferar (fig. I3.1, B) y siguen uno de los tres siguientes destinos:

1. Diferenciación a células plasmáticas (PC) de vida corta extra-foliculares (fig. I3.1, C). Estas PC producen mayoritariamente IgM.
2. Diferenciación a linfocitos B de memoria independientes de centro germinal (fig. I3.1, D). Dentro de este grupo, se encuentran parte de los linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (unswitched o IgM⁺IgD⁺CD27⁺).
3. Diferenciación a linfocitos B de memoria dependientes de centro germinal (fig. I3.1, E) (Takemori 2014). Dentro de este grupo se encuentran los linfocitos B de memoria sólo IgM⁺ (IgM⁺IgD⁻CD27⁺, fig. I3.1, H), los linfocitos B de memoria con cambios de isotipo (switched o IgM⁺IgD⁻CD27⁺, fig. I3.1, I) y la mayoría de los linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (unswitched o IgM⁺IgD⁺CD27⁺, fig. I3.1, J).

La diferenciación a linfocitos B de memoria dependientes de centro germinal ocurre cuando tras la activación de los linfocitos B, algunas de estas células proliferativas retornan al folículo donde sufren rondas de proliferación rápidas para formar el centro germinal (fig. I3.1, E); en la zona oscura del centro germinal (centroblasto), densamente poblada de células proliferando, se produce la expansión y la diversificación del BCR por hipermutación somática (fig. I3.1, F). Aquellas células que salen de este ciclo se dirigen a la zona clara del centro germinal (centrocito) poblada de células dendríticas foliculares (FDC) y de linfocitos T_H (fig. I3.1, G). En esta zona se produce la maduración de la

afinidad y el cambio de isotipo, y en este punto, los linfocitos B pueden re-entrar al centroblasto o salir como linfocitos B de memoria (Fig. I3.1, H, I, J) o como PC de vida larga¹²⁹⁻¹³².

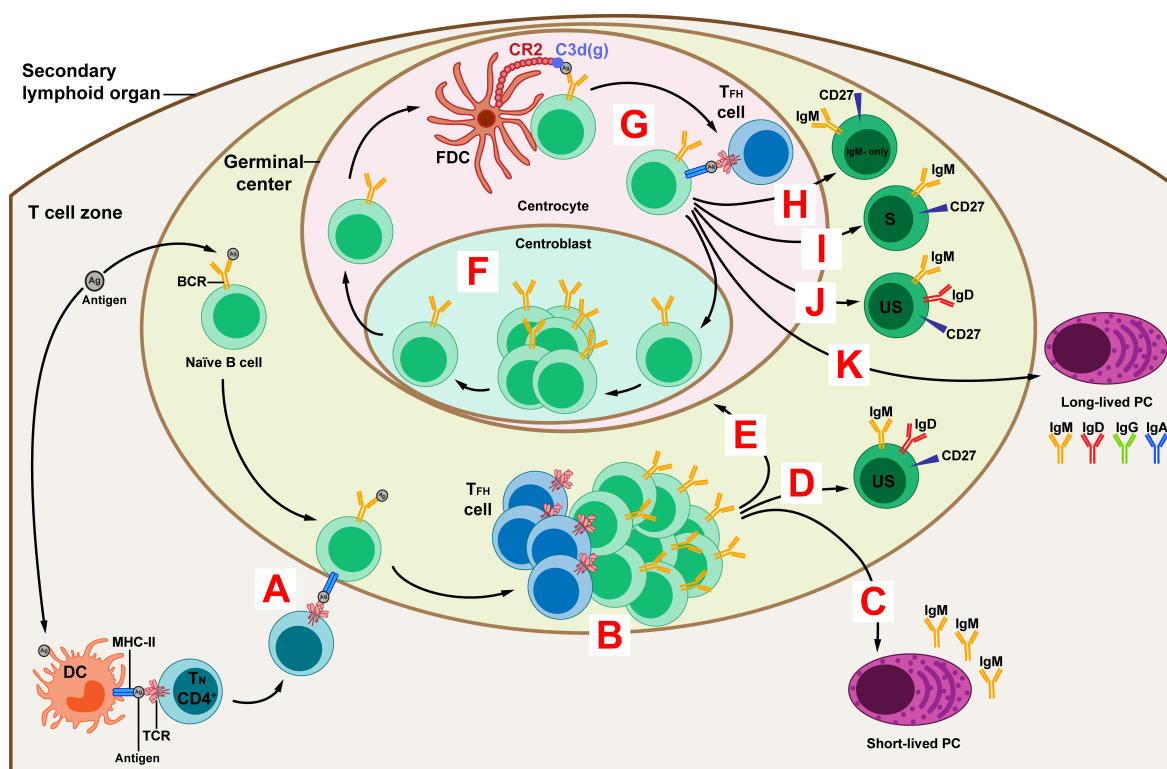


Figure I3.1. Memory B cell differentiation. DC, dendritic cell; TN CD4⁺, naïve CD4⁺ T cell; TCR, T cell receptor; BCR, B cell receptor; TFH, T follicular helper CD4⁺ T cells; FDC, follicular dendritic cells; CR2, complement receptor 2. Adapted from Kurosaki *et al.*, 2015¹³¹ and Phan&Tangye, 2017¹³².

3.2.Participación del complemento en la diferenciación y en la función B

La regulación de los linfocitos B a través del complemento está directamente conectada con su capacidad opsonizante más que por su implicación en inflamación, como ocurre con las DC⁵⁶. Hace más de 40 años se demostró que la producción de anticuerpos dependiente del timo se veía afectada cuando la proteína C3 se deplecionaba mediante el factor de veneno de cobra^{133, 134}. Años más tarde se comprobó que el mecanismo de dicho fenómeno se debía a la interacción entre los fragmentos de C3 C3d(g) con su receptor, CR2¹³⁵.

CR2, también conocido como CD21, se expresa principalmente en linfocitos B maduros, y como parte del conjunto de RCA, está formado por 15-16 dominios CCP, un dominio transmembrana y cola corta intra-citoplasmática¹³⁶. Junto con CD19, CD81 forman el co-receptor de linfocitos B, que actúa disminuyendo el umbral de activación del BCR¹³⁷⁻¹³⁹. Además, el co-activación del BCR por el co-receptor potencia el procesamiento de los antígenos y su presentación a los linfocitos T¹⁴⁰.

La unión de un antígeno opsonizado por fragmentos C3d(g) a linfocitos B a través de CR2 disminuye significativamente (entre 1000 y 10000 veces) dicho umbral de activación¹⁴¹⁻¹⁴³, y con ello, potencia la producción de anticuerpos y facilita la diferenciación de linfocitos B naíf hacia linfocitos B de memoria y PC de vida larga^{144, 145}.

CR2 también se expresa en la superficie de las FDC. En la generación de linfocitos B de memoria dependientes de centro germinal, las FDC pueden unir antígenos opsonizados con fragmentos de C3d(g) vía CR2 y presentarlos a linfocitos B naíf o primados en los centrocitos de los centros germinales, favoreciendo la maduración de la afinidad, el cambio de isotipo y la generación de linfocitos B de memoria y de PC de vida larga^{123, 146-149}.

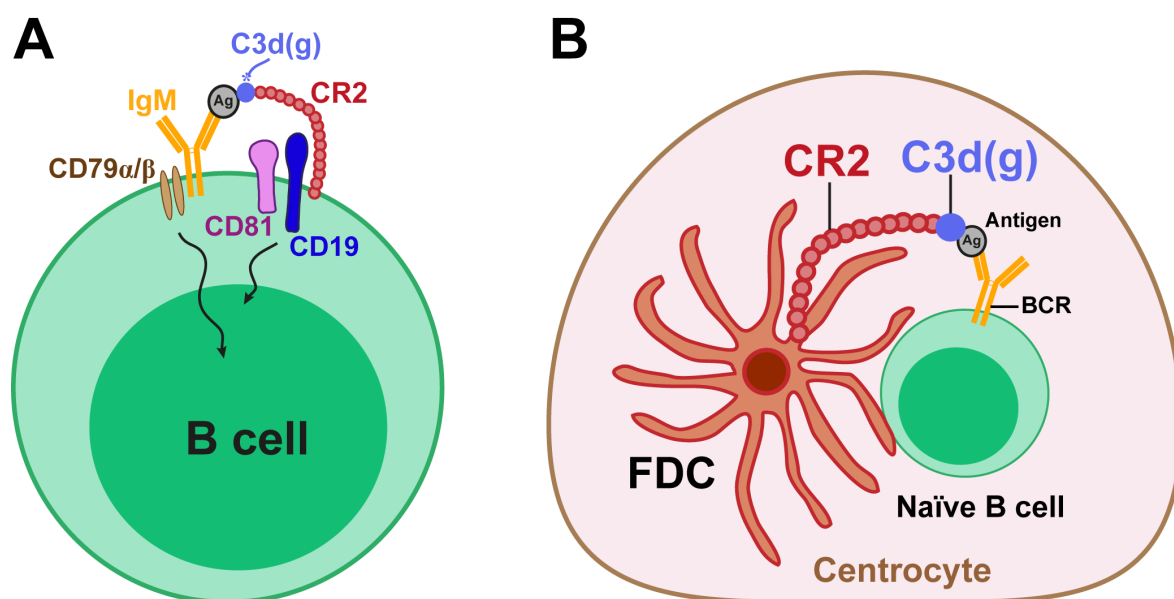


Figure I3.2. Complement in B cell activation and function. **A.** CR2 binding of C3d(g)-opsonized antigens lowers BCR threshold activation. **B.** During the processes of affinity maturation, isotype switching, and generation of long-lived PC and memory B cells, FDC capture C3d(g)-opsonized antigens via CR2 and present them to naïve or primed B cells within the centrocyte of germinal centers.

La mayor parte de los estudios que demuestran el papel del complemento en la diferenciación y función de los linfocitos B se habían realizado en modelos de ratón¹⁵⁰, pero recientemente se ha demostrado que los pacientes con deficiencia de CR2 presentan una hipogammaglobulinemia que se debe a una co-estimulación del receptor de linfocitos B (BCR) sub-óptima¹⁵¹.

Sin embargo, el complemento extracelular no sólo participa en la función de linfocitos B a través de receptores de complemento. Los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR) también interactúan con los receptores de complemento para modular funciones de linfocitos B. Algunas moléculas procedentes de células microbianas o productos derivados del daño a las células propias (ácidos nucleicos, zimósán, lipopolisacáridos) desencadenan rápidamente la activación del complemento del mismo modo que la señalización vía TLR¹⁵². Los linfocitos B activados con la cepa Cowan I (*Staphylococcus aureus*) +IL-2

expresan C3aR, C3a así como C3a(desArg), los cuales son capaces de ejercer un efecto supresor en la producción de anticuerpos y citocinas vía TLR2^{153, 154}.-

Los receptores de complemento y los TLR también podrían estar involucrados en la mayor incidencia de enfermedades autoinmunes en mujeres que en hombres. En un estudio de 2011 la frecuencia de los linfocitos B CR3⁺CR4⁺CR2⁻ (inducidos por TLR7) fue superior en ratonas añosas que en las hembras jóvenes o que en machos de cualquier edad. Estos hallazgos se apoyaban en que además los linfocitos B CR4⁺CR2⁻ estaban presentes en sangre periférica de mujeres ancianas con artritis reumatoide o esclerosis sistémica, pero no en mujeres control sanas¹⁵⁵.

La proteína reguladora C4BP tiene otras funciones más allá de servir como cofactor para fli o disociando la convertasa de C3/C5 de la CP y LP. Es capaz de unirse directamente a la proteína co-estimuladora CD40 sobre los linfocitos B en un sitio diferente al de su ligando, (CD40L). Cuando se une a CD40, C4BP induce la proliferación, el aumento de la expresión de las proteínas CD54 y CD86, y el cambio de isotipo de IgE dependiente de la IL-4 en los linfocitos B normales. Todo ello sugiere que además de regulador, C4BP puede ser un ligando activador de CD40, estableciendo una nueva relación entre el complemento y la activación de los linfocitos B¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

La auto-reactividad de los linfocitos B también es otro proceso que el complemento regula estrechamente. Se ha demostrado que C4 es esencial para el mantenimiento de la tolerancia B periférica^{159, 160}. La deficiencia de C4 da lugar a la aparición de linfocitos B auto-reactivos durante su maduración en los centros germinales, lo que podría explicar por una falta de eliminación de las células y restos apoptóticos que genera un defecto en la propia presentación por las APC, que a su vez es imprescindible para la educación y tolerancia B periférica¹⁶¹. En este contexto, estudios en ratón han mostrado que la falta de respuesta frente a antígeno de los linfocitos B anérgicos puede ser sobrepasada por la presencia de antígenos que han sido opsonizados por fragmentos de C3d(g)¹⁶².

Su participación en la biología de los linfocitos B da lugar a que el complemento contribuya a la aparición de enfermedades autoinmunes como consecuencia de la disminución del umbral de activación de los linfocitos B. Como ejemplo, en la artritis inducida por colágeno en modelos murinos, la depleción de C3 disminuye la severidad de la enfermedad¹⁶³. Además, el sistema de complemento puede modificar la respuesta específica de antígeno de los linfocitos B en el modelo de encefalitis autoinmune experimental o EAE y posiblemente en la esclerosis múltiple. En el modelo de ratón de EAE, el consumo de proteínas de complemento usando el factor de veneno de cobra atenúa significativamente la clínica y el fenotipo histológico de la enfermedad^{164, 165}.

4. Deficiencia de C3

La proteína C3 es la proteína más abundante del sistema de complemento, y sus niveles en suero son de aproximadamente 1 gr/L tanto en adultos como en neonatos¹⁶⁶.

El gen C3 humano se localiza en el cromosoma 19¹⁶⁷ y está formado por 41 exones con sus respectivos intrones. La síntesis de C3 tiene lugar mayoritariamente en hepatocitos, y de forma intracelular se forma una molécula precursora (Pro-C3) de aproximadamente 200 kDa, que tras sufrir un corte proteolítico, da lugar a dos subunidades o cadenas unidas por un puente disulfuro: C3- β (aminoácidos 1-645; 110 kDa) y C3- α (aminoácidos 650-1641; 75 kDa), que conforman la molécula de C3 madura (fig. I4.1, A) de 187 kDa. Estas dos cadenas se organizan en 13 dominios¹⁶⁸: 8 dominios macro-globulina (MG1-8), un dominio anafilotoxina (ANA), un dominio “linker” (LNK), un dominio CUB (también llamado C1r/C1s, Uegf o Bmp1), un dominio que contiene el enlace tioéster (C988-Q991) o dominio TED y el dominio C345C (cuyo nombre viene de *complement C3, C4 and C5 C-terminal*). Además, tras la escisión de C3a, se forma un lazo en la región N-terminal de la cadena C3- α , que en C3b se denomina α' , llamado α' -NT. La unión del dominio C345C a los dominios MG7 y MG8 se produce gracias a una región de anclaje o *anchor* (fig. I4.1, A y B).

C3 es el componente del sistema de complemento en el que convergen sus tres vías de activación y por ello participa en múltiples funciones como:

- Formación de las convertasas de C3 y C5¹⁶⁹.
- Producción de las opsoninas —C3b/iC3b/C3d(g)— que posibilitan las fagocitosis y eliminación de microorganismos¹⁷⁰.
- Degranulación de mastocitos y basófilos mediada por C3a y C5a.
- Solubilización y eliminación de los inmunocomplejos opsonizados por C3b¹⁷¹.
- Función adyuvante de C3d y C3dg en la activación y producción de anticuerpos en los linfocitos B^{141, 142}.
- Eliminación de células apoptóticas por unión de iC3b a CR3 y C34 en macrófagos¹⁷².

Precisamente porque participa en diferentes etapas de la respuesta inmunitaria, la deficiencia de C3 se ha asociado a infecciones graves recurrentes y a enfermedades mediadas por inmunocomplejos, especialmente a glomerulonefritis, así como a enfermedades autoinmunitarias, como el lupus eritematosos sistémico¹⁷³.

La deficiencia de C3 puede ser primaria —cuando ocurre como consecuencia de defectos directos sobre su síntesis, expresión o secreción— o secundaria/adquirida —cuando tiene lugar debido a defectos en proteínas reguladoras como fI o fH— en la que se produce un consumo excesivo de C3 en plasma que se asemeja a la condición de deficiencia primaria¹⁷⁴.

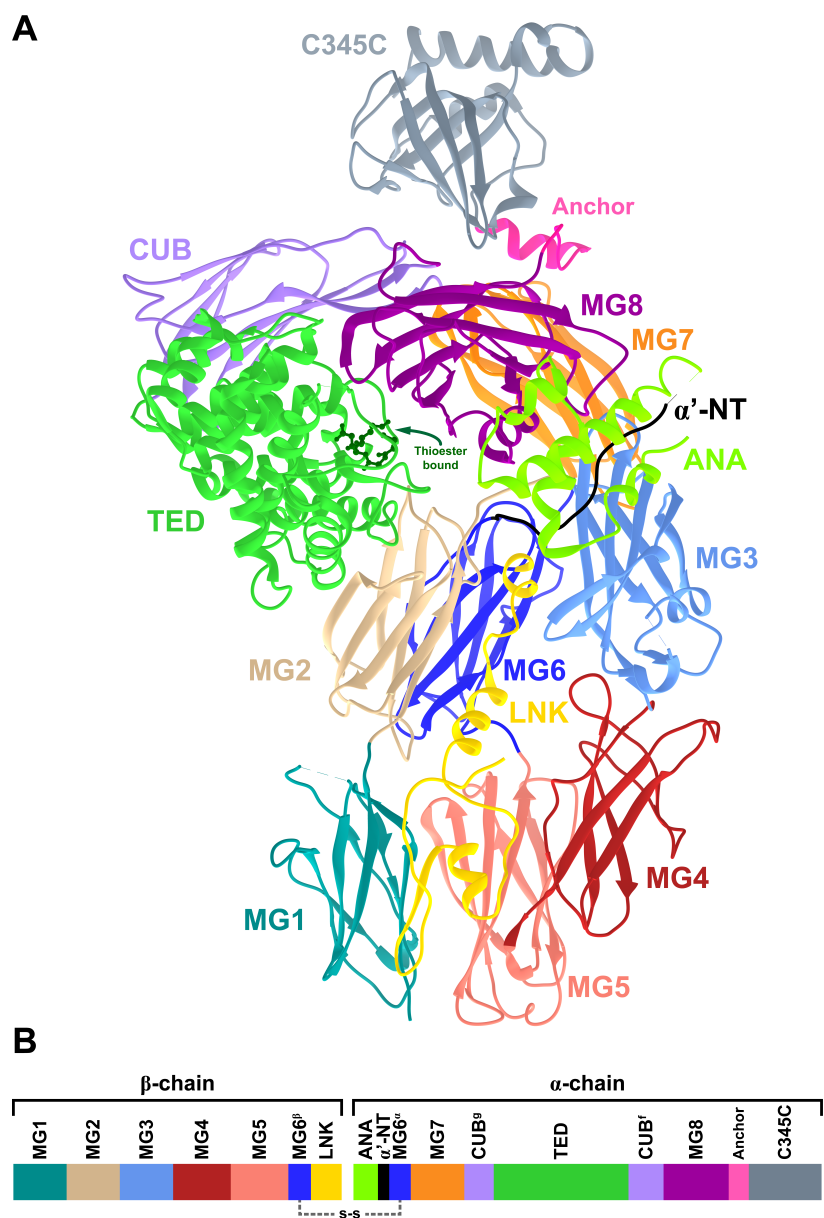


Figure I4.1. Molecular structure of C3. **A.** Ribbon representation of native C3 showing all the C3 domains (Protein Data Bank #2A73), with TED domain containing the thioester bound (dark green arrow). **B.** Domain sequence of C3. MG, macroglobulin domain; ANA, anaphylatoxin domain (C3a after cleavage); LNK, linker domain; TED, thioester-containing domain. Based on Janssen *et al.*, 2005¹⁶⁸.

4.1. Primaria

La deficiencia primaria de C3 plasmático (OMIM #613779) ocurre por mutaciones en el gen *C3* que resultan en una reducción o ausencia de la proteína en el suero, o en defectos funcionales de la misma¹⁷⁵. Su reducida prevalencia la engloba dentro del conjunto de las enfermedades raras y tiene un patrón de herencia autosómico recesivo, de forma que muchos de los casos descritos hasta la fecha han ocurrido en familias consanguíneas¹⁶⁶. La deficiencia primaria de C3 se ha descrito en menos de 50 individuos de todo tipo de etnias, pero su baja prevalencia y la heterogeneidad en su fenotipo no han permitido establecer una buena correlación genotipo-fenotipo, y son muy pocos los casos publicados en los que las causas genéticas han sido bien caracterizadas^{174, 176-178}. Los estudios moleculares realizados en aquellos casos cuya mutación sí ha sido determinada demuestran que generalmente la deficiencia primaria de C3 ocurre como consecuencia de mutaciones en homocigosis en *C3*, mientras que en los progenitores dichas mutaciones aparecen en heterocigosis y resultan en una reducción aproximada del 50% de C3 en plasma¹⁷⁹. Sin embargo también se han descrito casos en los que las mutaciones causantes de la deficiencia en plasma de C3 estaban en heterocigosis^{120, 177}.

Típicamente, la deficiencia primaria de C3 se asocia a infecciones recurrentes de las vías respiratorias altas —causadas principalmente por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*— que pueden presentarse conjuntamente con enfermedades relacionadas con depósitos de inmunocomplejos, como pueden ser el lupus eritematoso sistémico o la glomerulonefritis membranoproliferativa/GNMP^{174, 178}. Además, la presencia de mutaciones y de polimorfismos en *C3* se ha asociado con el riesgo a padecer patologías como degeneración macular asociada a la edad, síndrome hemolítico urémico atípico, enfermedad por depósitos densos¹⁸⁰⁻¹⁸⁴, así como con el mal pronóstico del trasplante de ciertos órganos¹⁸⁵ y la mala respuesta ante ciertas pautas de vacunación¹⁸⁶.

4.2. Secundaria

La deficiencia secundaria o adquirida de C3 plasmático ocurre como consecuencia de defectos en proteínas reguladoras de la convertasa de C3 de la AP (C3bBb), como fI o fH. También puede darse como resultado de la presencia de auto-anticuerpos (C3NeF y C4NeF) que estabilizan las convertasas de C3 tanto de la AP como de la CP/LP (C4bC2b) impidiendo su disociación por los reguladores y dando lugar a GNMP^{187, 188}.

Dado que la falta de fI o fH conlleva defectos en el *loop* de amplificación de la AP, la deficiencia de estos reguladores también se asocia con niveles bajos en plasma de factor B, C5 y properdina como consecuencia de la activación constante de esta ruta¹⁷⁴.

En esta tesis se va a considerar solamente la deficiencia secundaria de C3 plasmático debida a la deficiencia de fI.

4.2.1. Deficiencia de factor I

La proteína fI es una serín proteasa que se encarga de inactivar a C3b — generando iC3b y C3d(g) — y a C4b — dando lugar a C4c y C4d — con la ayuda de las proteínas cofactoras C4BP, fH, CR1 y MCP/CD46¹⁸⁹. El gen *CFI* se localiza en el cromosoma 4q25¹⁹⁰ y está organizado en 13 exones con un gran intrón (35 kb) entre los exones 1 y 2¹⁹¹. *CFI* codifica para una proteína glicoproteína de 583 aminoácidos (88 kDa) que

está formada por dos cadenas polipeptídicas (una cadena pesada de 50 kDa y una cadena ligera de 38 kDa) unidas por un puente disulfuro^{192, 193} que circula en su forma activa a una concentración de unos 30-50 ug/mL en suero basalmente, que puede aumentar durante procesos inflamatorios al ser una proteína de fase aguda¹⁹⁴. La cadena pesada contiene la región N-terminal glicosilada y está organizada en dos dominios LDLr, un dominio SRCR (o tipo CD5) y un dominio FIMAC¹⁹⁵, mientras que la cadena ligera contiene el dominio serín proteasa catalítico (fig. I4.2).

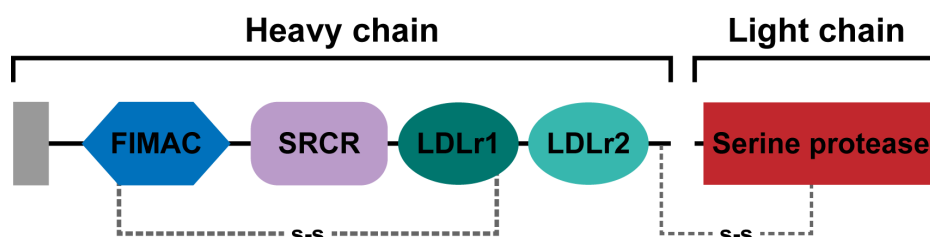


Figure I4.2. Domain sequence of complement factor I. FIMAC, factor I membrane attack complex domain; SRCR, scavenger receptor cysteine-rich domain; LDLr1/2, low-density lipoprotein receptor domains. Gray area denote N-linked glycosylation sites. Based on Roversi *et al.*, 2011¹⁹⁵.

La deficiencia completa de fI (OMIM #610984) es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva y hasta la fecha se han descrito alrededor de 40 casos debidos a 17 mutaciones^{194,196-206}. La falta de fI da lugar a un consumo constante del C3 plasmático que resulta en una deficiencia secundaria o adquirida de C3. Por ello, las patologías más comúnmente asociadas a la deficiencia de fI son similares a las de la deficiencia primaria de C3 plasmático, e incluyen infecciones graves debidas a microorganismos encapsulados, glomerulonefritis²⁰⁷, síndrome hemolítico urémico atípico así como enfermedades autoinmunes^{174, 197-199, 208, 209}.

V. OBJETIVOS

V. OBJETIVOS

El sistema de complemento se considera, al margen de su papel defensivo, un puente entre la inmunidad innata y adaptativa a través de los receptores leucocitarios de complemento. De sus más de 50 proteínas, C3 es la más abundante y en la que convergen sus tres vías de activación, por lo que se cree que tiene un gran impacto en la diferenciación y función leucocitaria, en particular en los linfocitos B a través de CR2. Sin embargo, los estudios publicados son mayoritariamente en ratón.

Los recientes artículos que postulan que la activación intracelular de C3, más que la extracelular o plasmática, tiene gran importancia en la diferenciación y función de los linfocitos T y posiblemente de todos los leucocitos, han complicado la interpretación de los datos disponibles.

Por tanto, el C3 podría co-estimular a los linfocitos T y B y a otros leucocitos desde dentro y desde fuera, pero la contribución relativa de cada ruta sigue siendo desconocida, especialmente en humanos.

Nos planteamos que la deficiencia primaria de C3 plasmático debida a mutaciones congénitas en C3 carecería de señales intra y extracelulares mediadas por dicha proteína, mientras que la deficiencia secundaria (por consumo) de C3 plasmático, como la que causa la deficiencia congénita de la proteína reguladora factor I, carecería sólo de las segundas. Por tanto, su comparación podría arrojar luz sobre el papel del C3 plasmático vs intracelular en la inmunidad adaptativa.

Para abordar dicha comparación se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el efecto de la deficiencia primaria vs secundaria del C3 plasmático sobre el fenotipo, diferenciación y función de los linfocitos T, las células dendríticas y los linfocitos B humanos.
2. Estudiar la activación intracelular de C3 en líneas linfoblastoides T y B derivadas de pacientes con deficiencia primaria o secundaria de C3 plasmático, en comparación con controles.

VI. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

VI. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes

Los resultados que se recogen en este trabajo han sido realizados con muestras de sangre periférica de pacientes (y sus familiares cuando fue posible) con deficiencia plasmática de C3. En total se han estudiado diez individuos pertenecientes a seis familias con deficiencia plasmática de C3 debida a mutaciones en *C3* o en *CFI* (Tabla PMM1 y Tabla R1). En todos los análisis, como individuos control, se utilizaron muestras de donantes sanos pareados en edad y sexo.

Todas las muestras analizadas se obtuvieron tras la firma del consentimiento informado (ver modelo en Anexo 1) por parte de los pacientes o sus responsables legales, y todos los estudios aquí recogidos han sido realizados de acuerdo a los principios expresados en la Declaración de Helsinki y aprobados por los Comités Éticos de Investigación de los hospitales participantes.

1.1. Deficiencia primaria de C3 plasmático

A continuación se describen los casos clínicos de los individuos con deficiencia de C3 plasmático debida a mutaciones en *C3*:

1.1.1. Familia C3.1

C3.1.II:1 es un varón de 17 años de edad, de origen paquistaní y procedente de padres consanguíneos, con glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP) de tipo I y deficiencia primaria por mutación en homocigosis de C3. Desde los 12 hasta los 15 años ha sufrido episodios cutáneos de vasculitis negativas para IgA y artralgiar en rodillas similares a lesiones tipo púrpura de Schönlein-Henoch (PSH). Sufrió un episodio severo de neumonía con derrame pleural que precisó drenaje torácico. A pesar de la presencia de microhematuria y microalbuminuria, la función renal es normal. Las biopsias renales mostraron depósitos glomerulares lineales negativos para C3, con una intensidad de inmunofluorescencia elevada (4/4) para IgM, C4 y C1q, e intermedia (3/4) para IgA, IgG, kappa y lambda, además de depósitos mesangiales de intensidad baja (2/4) para IgA, IgG, C4 y C1q.

C3.1.I:1 es su padre (HC) con bajos niveles de C3 plasmático.

1.1.2. Familia C3.2

C3.2.II:1 es un paciente de 12 años de origen español con GNMP negativa para inmunofluorescencia, y con deficiencia primaria de C3 en homocigosis. Presentaba hematuria macroscópica de características glomerulares, pero no mostraba síntomas de disfunción renal o enfermedades infecciosas. Al igual que el paciente C3.1.II:1, exhibía vasculitis negativas para IgA recurrentes tipo PSH en los miembros inferiores. A los 12 meses sufrió una meningitis aguda aséptica. Recibió una inmunización completa con dos dosis de Prevenar® antes de los 2 años de edad y mostraba niveles elevados de IgG frente a neumococo por una dosis de PPV-23, (Pneumovax®23) suministrada a los 8 años. Además mostraba esplenomegalia de larga evolución asociada con anemia

hemolítica no inmune (test de Coombs directo negativo). Se descartaron la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la hemoglobinuria paroxística nocturna. Las inmunofluorescencias de las biopsias renales fueron repetidamente negativas.

C3.2.I:2 es su madre (HC) con bajos niveles de C3 plasmático.

1.1.3.Familia C3.3

C3.3.II:2 es un varón de 38 años de origen español con GNMP tipo I y con deficiencia primaria de C3 en heterocigosis, proteinuria y hematuria moderada. A los 15 años sufrió un episodio de sepsis con PSH generalizada e insuficiencia renal. La biopsia del córtex renal mostró una gran proporción de glomérulo esclerotizado. Las regiones no esclerotizadas del glomérulo mostraron una morfología lobular, proliferación mesangial, hiper celularidad endocapilar y un engrosamiento de las paredes capilares. La inmunofluorescencia directa reveló un depósito intenso granular de C3 en el mesangio y en las regiones periféricas y una tinción leve de IgM, IgA, C1q y de cadenas kappa en las regiones subendoteliales periféricas.

1.1.4.Familia C3.4

C3.4.I:1 es un varón de 48 años de origen español, con deficiencia primaria de C3 en heterocigosis con niveles muy bajos de C3 plasmático. Es asintomático a pesar de mostrar proteinuria y microhematuria leves.

1.2.Deficiencia secundaria de C3 plasmático

A continuación se describen los casos clínicos de los individuos con deficiencia de C3 plasmático debida a mutaciones en *CFI*:

1.2.1.Familia CFI.1

CFI.1.II:1 es una mujer de 39 años con deficiencia secundaria de C3 plasmático debido a una mutación en homocigosis en FI reportada previamente²⁰⁰. Debutó a los 16 años con septicemia meningocócica asociada a su menstruación. Desde los 22 años ha desarrollado hasta 20 episodios con recurrencia mensual de meningitis aguda coincidentes con el período perimenstrual²¹⁰.

CFI.1.II:4 es la hermana menor de CFI.2.II:1. Tiene 29 años y presenta la misma deficiencia secundaria de C3 plasmático y el mismo genotipo.

CFI.1.I:2 es su madre (HC) con niveles normales de C3 y FI plasmáticos.

1.2.2.Familia CFI.2

CFI.2.II:2 es una mujer de 53 años con deficiencia secundaria de C3 plasmático debido a una mutación en homocigosis en FI descrita previamente²⁰⁰. Sufrió varios episodios de otitis durante su infancia y a los 11 años fue diagnosticada de poliartritis juvenil crónica y PSH. A los 17 años sufrió meningitis meningocócica y a los 19 años sufrió neumonía meningocócica. Dos de sus hermanos han presentado un historial clínico de enfermedades infecciosas (otitis, artritis séptica y meningitis linfocítica) y presentan la misma mutación en homocigosis. Actualmente está asintomática.

2.Materials

2.1.Células y líneas celulares

Los estudios de este trabajo han sido realizados mayoritariamente en leucocitos primarios y en linfocitos transformados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para los estudios celulares, la sangre fue recogida en tubos con EDTA en el Hospital Universitario y Politécnico de La Fe (Valencia) y en el Hospital Universitario La Paz (Madrid). En la Tabla PMM2.1 se recoge la información sobre las células y líneas celulares utilizadas en este estudio.

Tabla PMM1. Familias estudiadas		
Familia	Individuo	Código*
C3.1	I:1	C3.1.I:1
	II:1	C3.1.II:1
C3.2	I:2	C3.2.I:2
	II:1	C3.2.II:1
C3.3	II:2	C3.3.II:2
C3.4	I:1	C3.4.I:1
CFI.1	I:2	CFI.1.I:2
	II:1	CFI.1.II:1
	II:4	CFI.1.II:4
CFI.2	II:2	CFI.2.II:2

*Ver figura R1.2.

2.2.Reactivos y kits

Tabla PMM2.2. Reactivos y kits	
Reactivos	
Producto	Casa comercial / proveedor
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Panreac
Acrilamida	Sigma-Aldrich
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich
Antibiótico/antimicótico (10000 UI/mL penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina, 25 µg/mL anfotericina B)	Gibco
Azida de sodio (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
Azul de tripano	Life Technologies
Bloqueante de receptores Fc humanos	BD Biosciences
Brefeldina A	Sigma-Aldrich
Brij96V	Lab. Dr. W. Schamel
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich
Carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE)	Life Technologies / Sigma-Aldrich
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac

Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Panreac
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Panreac
Dynabeads® CD3/CD28	Invitrogen
Etanol	Panreac
Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos recombinante humano (rh-GM-CSF)	Immuno Tools
Fibronectina	Sigma-Aldrich
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare
Fluoruro de sodio (NaF)	Sigma-Aldrich
Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)	Sigma-Aldrich
G418 (geneticina)	Calbiochem
Glicerol	Sigma-Aldrich
Glicina	Sigma-Aldrich
Glucosa	Sigma-Aldrich
Ham's F-12 con L-glutamina	Lonza
IL-2 recombinante humana (rh-IL-2)	Dr. Craig W. Reynolds
IL-4 recombinante humana (rh-IL-4)	Immuno Tools
Inhibidores de proteasas (cocktail set III)	Calbiochem
Isonomicina	Sigma-Aldrich
Leucoaglutinina de Phaseolus vulgaris (PHA-L)	Sigma-Aldrich
L-glutamina	Gibco
Lipopolisacárido (LPS)	Sigma-Aldrich
Lowry DC™ Protein Assay	BIO-RAD
Medio de montaje con DAPI (ProLong® Gold)	Molecular Probes
Medio de montaje con DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories
Metanol	Panreac
MicroBeads CD14	Miltenyi Biotec
N,N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka
Paraformaldehído (PFA)	Panreac
Patrón estándar de peso molecular de proteínas (DUAL-COLOR)	BIO-RAD
Perm/Wash 10X	BD Biosciences
Persulfato de amonio (APS)	BIO-RAD
Pervanadato de sodio (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich
Phytolacca americana pokeweed (PWM)	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 sin L-glutamina	Lonza
Saponina	Sigma-Aldrich
Solución de bloqueo para Odyssey® (SDS-PAGE)	LI-COR
Suero bovino fetal (FBS)	Gibco
Suero de cabra	Sigma-Aldrich
Suero de conejo	Sigma-Aldrich
Suero de ratón (IgG)	Sigma-Aldrich
Suero humano (IgG1)	Sigma-Aldrich
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	Toxin Technology
Superantígeno B (Enterotoxina estafilocócica B)	Toxin Technology
Superantígeno E (Enterotoxina estafilocócica E)	Sigma-Aldrich
Tampón de carga reductor 5X	Sigma-Aldrich

Tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS), sin Ca ²⁺ , sin Mg ²⁺	Gibco
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizma® base (Tris base; Tris(hidroximetil)aminometano)	Sigma-Aldrich
Trizma® clorhidrato (Tris HCl)	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
Kits	
Producto	Casa comercial / proveedor
Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1, Th2, Th17	BD Biosciences
ELISA para detección de IgG de neumococo	Un. Inmunología H. La Paz
Enzygnost® anti-Measles virus IgG kit	Siemens
Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience
Human anti-Diphtheria Toxoid IgG EIA kit	Binding Site
ImmunoCAP® Rc208 kit	Phadia
Rubella ELISA IgG kit	Vircell
Varicella ELISA IgG kit	Vircell

2.3. Medios de cultivo, tampones y soluciones

Tabla PMM2.3. Medios de cultivo, disoluciones y tampones	
Medios de cultivo	
Nombre	Composición
Ham's F-12 completo	Ham's F-12 con L-glutamina 10% FBS 1% Antibiótico-Antimicótico
Ham's F-12 completo selectivo	Ham's F-12 con L-glutamina 10% FBS 1% Antibiótico-Antimicótico 0,8 µg/mL G-418
Medio para congelación celular	40% RMPI-1640 sin L-glutamina 50% FBS 10% DMSO
RPMI completo	RPMI-1640 sin L-glutamina 10% FBS 1% L-glutamina 1% Antibiótico-Antimicótico
RPMI completo EBV	RPMI-1640 sin L-glutamina 20% FBS 1% L-glutamina 1% Antibiótico-Antimicótico
RPMI completo HTLV-I	RPMI-1640 sin L-glutamina 10% FBS 1% L-glutamina 1% Antibiótico-Antimicótico 100 UI/mL rh-IL-2

RPMI completo MDDC	RPMI-1640 sin L-glutamina 10% FBS 1% L-glutamina 1% Antibiótico-Antimicótico 800 UI/mL rh-GM-CSF 600 UI/mL rh-IL-4 0,5 µg/mL LPS (48 h)
--------------------	---

Disoluciones

Nombre	Composición
DPBS	Agua milliQ 9,55 gr DPBS
DPBS-BSA	DPBS 1X 0,1% BSA 0,01% ázida de sodio
Gel concentrador (SDS-PAGE)	4,5% Acrilamida 0,1% SDS 125mM TRIS 0,1% APS 0,1% Temed
Gel separador (SDS-PAGE)	12-15% Acrilamida 0,1% SDS 375mM TRIS 0,1% APS 0,04% TEMED

Tampones

Nombre	Composición
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	Agua milliQ 36,9 gr/L Trizma® base 153,9 gr/L Trizma® HCl
Tris-HCl 1,0M pH 6,8	Agua milliQ 13,4 gr/L Trizma® base 140,4 gr/L Trizma® HCl
Tris-HCl 1,0M pH 7,6	Agua milliQ 27,8 gr/L Trizma® base 121,2 gr/L Trizma® HCl
Tampón Tris salino (TBS)	Tris-HCl 50mM pH 7,6 150mM NaCl Tris-HCl 50mM pH 7,6
Tampón TBS-Tween	150mM NaCl 0,1% Tween® 20
Tampón de electroforesis 1X (SDS-PAGE)	25mM Trizma® base 192 mM Glicina 0,1% SDS
Tampón de transferencia 1X (SDS-PAGE)	25mM Trizma® base 200 mM Glicina 20% Metanol

Tampón de lisis de eritrocitos	Agua milliQ 150mM NaH ₄ Cl 10mM KHCO ₃ 0,1mM Na ₂ EDTA
Tampón de lisis celular NP40	Agua milliQ 1% NP-40 50 mM Tris-HCl pH 7,6 100 mM NaCl 10% Glicerol 2 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄ 25 mM NaF 0,1% inhibidores de proteasas

2.4.Cebadores de la PCR

Tabla PMM2.4. Cebadores de la PCR			
Gen	Exón	Directo	Inverso
C3	E1	TCCCAGCCTACAGAGAGATTTCCT	CCAAATGTCTGCTTCCACCC
	E2	TGGGAGTCATGGTGGCTGCT	TTCAGTGGGAGGGACTTAGAGGG
	E3, 4	TCGCACCTCCTTCACATGCC	CCCTTCCGGTGTGTCTTTCTCTG
	E5, 6, 7	CCCACCTGGGTCCCTGTTCT	CCTGGTCTTCACCTGGTCCCT
	E8, 9	GCCAGGTGAGAGGCCAGCAG	CCCTCTCAGACTGGGCCTACCC
	E10, 11	GAAGTTGGGGTCCATTCTGAGGG	GTTTCCTCAAACCTGCGGACCC
	E12, 13	CACCAATTCCCAGGTCTCAGGG	GCGAGCCCAGGGCACACTTA
	E14	AGCACCCACTCCATCCCAGG	CCCAATTGGAACCCATGTCCA
	E15, 16, 17	TCACGGAGAAGCGAATGGAC	CAGACAGGGGCCTCCTCCC
	E18, 19	GGCCTCCCTAAGTGCTGGGATT	GCCATCGAGGCTGGCCCTCT
	E20, 21	GGCTTCAGCAAAGACAGGCTGA	GGGACTTCCAAATTTCTAAGCTGG
	E22, 23	GGACAGTGCCCTGCTGACCA	CAGATGGGCTGTTCTAGCTGAAGG
	E24	CCCTGTGAAGCACCTCCCAC	AGGGCCTCAGAGGGCGTAGC
	E25, 26	CCACCTCCTCGTTCTGATCCC	TGGAGTGACGCCTCTGGCTC
	E27	TGACCTTCCTAGGGTAGCGGG	GCAGTGATGTCTGTTATTGCACTGG
	E28, 29	TGCAGCAACAAGGCAGCTCA	CCTGAACCTGGGCCCTGAGA
	E30, 31, 32, 33	CCACTTTCCCAGGCTCCCAG	GCAAAGCAAGGACTGTCTGTGTTG
	E34, 35	CCCTCTGTGCTGCTATGTGGGA	GACCCTGTCTCCTCTGGCCC
	E36	CAGTCCCAAGACAATGCTGG	TCAGACCCGTGGGACCTTCA
	E37, 38	GCCTGCGTGTCCCAGGAATC	ACAGCCACCCACGCAATGAT
	E39, 40, 41	TGGGCCATAGTGTGACTGGCT	GCTGTGAGCTGCCGGTGAGT

	E1	TCTTCCCTGGAATACAGAATTGA	TCAATTAAAAATTGTTTGCATAAAGG
	E2	CTTGAAGCCACCAGACAACA	GGCAACCCCTGATTTGTTTA
	E3	CCTCATAGGGTTGATGTGAGG	GAAAGGTTAGGTAATCAAAAAGC
	E4	CTTGCCCAAGCTGTAACTCC	GCAATGTCTGAATGGCAAAA
	E5, 6	TCATGCCACCACTCCATAAA	AGTTCTGCAAATGCCCACTC
CFI	E7	GCTAGACATCCTACAATTCAAGG	GAAAAGGCCTGTACGCCTAAAC
	E8	CATGCCTTGGGGTTTTGTA	TCCAGTTTTTAAAAGCAATTCTCAA
	E9, 10	AAAAAGGCTAATGGGTTCAAGA	TCACTTTCATTGTTTCGGGA
	E11	TTCTGGGGAAATGAAAAAGG	GCCATGGCTGGATGTTTACT
	E12	TCCAATGGTTTAAAGTTATGAGA	CTGATGTGGTGGGAGGAGAT
	E13	GCAGCCTTGAAAAATGGAAG	AAAACCTGTATGCTTCACCAAAA

Fuente: Martínez-Barricarte *et al.*, 2010¹⁸¹ y Ponce-Castro *et al.*, 2008¹⁹⁹.

2.5.Anticuerpos

Tabla PMM2.5. Anticuerpos					
Anticuerpos directos					
Antígeno	Clon	Especie	Isotipo	Proveedor	Referencia
CD1a	HI149	Ratón	IgG1	BD Biosciences	559775
				BioLegend	300110
CD1c/BDCA-1	AD58E7	Ratón	IgG2a	Miltenyi Biotec	130-090-508
CD3	UCHT-1	Ratón	IgG1	Beckman Coulter	A07746
CD4	13B8.2	Ratón	IgG1	Beckman Coulter	A07751
					A07752
CD8	B9.11	Ratón	IgG1	Beckman Coulter	A07756
					A07758
CD14	MφP9	Ratón	IgG2b	BD Biosciences	340585
CD19	J3-119	Ratón	IgG1	Beckman Coulter	A07771
CD21	B-ly4	Ratón	IgG1	BD Biosciences	561372
CD25	3G10	Ratón	IgG1	Invitrogen	MHCD2505
CD27	M-T271	Ratón	IgG1	BD Biosciences	555440
CD31	WM59	Ratón	IgG1	BD Biosciences	555446
CD45RA	ALB11	Ratón	IgG1	Beckman Coulter	IM0584U
CD80	L307.4	Ratón	IgG1	BD Biosciences	557227
CD86	2331 (FUN-1)	Ratón	IgG1	BD Biosciences	555657
					555660
CD123	9F5	Ratón	IgG1	BD Biosciences	340545
CD163	RM3/1	Ratón	IgG1	BioLegend	326508
CD303/BDCA-2	AC144	Ratón	IgG1	Miltenyi Biotec	130-090-510
HLA-ABC	G46-2.6	Ratón	IgG1	BD Biosciences	555552
HLA-DR	L243	Ratón	IgG2a	BD Biosciences	347364
	TU36	Ratón	IgG2b	BD Biosciences	555561
	Immu-357	Ratón	IgG1	Beckman Coulter	IM1639
IgD	IA6-2	Ratón	IgG1	BD Biosciences	555779
TCRαβ	IP26	Ratón	IgG1	BioLegend	306717
TCRγδ	11F2	Ratón	IgG1	BD Biosciences	333141

Anticuerpos indirectos					
Antígeno	Clon	Especie		Proveedor	Referencia
C3a	2991	Ratón	IgG1	Abcam	ab11873
C3-β chain	SIM27	Ratón	IgG2b	Dr. S. Rodríguez de Córdoba Dra. M. Domínguez	...
CD3	OKT3	Ratón	IgG1	eBioscience	16-0038-85
		Ratón	IgG1	Dra. C. Kemper	...
	UCHT-1	Ratón	IgG1	eBioscience	16-0037-85
CD3δ	APA1/2	Ratón	IgG1	Dr. B. Alarcón	...
CD3e	EPR5361 (2)	Conejo	IgG	Abcam	ab133628
CD28	CD28.2	Ratón	IgG1	BD Biosciences	555725
CD46	E4.3	Ratón	IgG2a	BD Biosciences	555948
CD46	TRA-2-10	Ratón	IgG1	Dr. J. Atkinson	...
EEA1 (Early endosome)	Policlonal	Conejo	IgG	Thermo-Fisher Scientific	PA1-063A
GM130 (Cis-Golgi)	Policlonal	Conejo	IgG	Thermo-Fisher Scientific	PA1-077
iC3b/C3dg	SIM320.12.2.1	Ratón	IgG1	Dr. S. Rodríguez de Córdoba Dra. M. Domínguez	...
iC3b/C3dg	SIM320.12.3.1	Ratón	IgG1	Dr. S. Rodríguez de Córdoba Dra. M. Domínguez	...
LAMP1 (Lysosome)	Policlonal	Conejo	IgG	Thermo-Fisher Scientific	PA1-654A
p44/42 MAPK (Erk1/2)	3A7	Ratón	IgG1	Cell Signaling Technology	9107
TGN46 (Trans-Golgi)	Policlonal	Conejo	IgG	Thermo-Fisher Scientific	PA1-1069
Anticuerpos secundarios					
Antígeno	Clon	Especie	Isotipo	Proveedor	Referencia
IgG de ratón	...	Cabra	...	Beckman Coulter	731856
IgG (H+L) de conejo	...	Cabra	...	LI-COR	925-68071
IgG (H+L) de conejo	...	Cabra	...	Thermo-Fisher Scientific	A27039
IgG (H+L) de ratón	...	Burro	...	LI-COR	926-32212
IgG (H+L) de ratón	...	Cabra	...	Thermo-Fisher Scientific	A28175
IgG (H+L) de ratón	...	Cabra	...	eBioscience	12-4010-87
IgG (H+L) de ratón	...	Cabra	...	BD Biosciences	550589
IgG (H+L) de ratón	...	Conejo	...	Life Technologies	A11059
Controles de isotipo					
Antígeno	Clon	Especie	Isotipo	Proveedor	Referencia
IgG1 de ratón	MOPC-21	Ratón	IgG1	Biolegend	319201
IgG1 de ratón	P3.6.2.8.1	Ratón	IgG1	eBioscience	14-4717-82
IgG2a de ratón	MG2a-53	Ratón	IgG2a	Biolegend	401501
IgG2b de ratón	eBMG2b	Ratón	IgG2b	eBioscience	14-4732-85
IgG de conejo	...	Conejo	IgG	Thermo-Fisher Scientific	026102

2.6.Aparatos y fungible de laboratorio

Tabla PMM2.6. Aparatos y fungible de laboratorio	
Aparato	
Nombre	Casa comercial / proveedor
Baño	MEMMERT
Bomba de vacío (VACUSAFE)	INTEGRA Biosciences
Cabinas de flujo laminar	Telstar / Heraeus
Cámara de Neubauer	HIRSCHMANN
Centrífugas	Hettich Lab Technology / Heraeus
Citómetro de flujo FACSCalibur	BD Biosciences
Citómetro de flujo FACScan	BD Biosciences
Citómetro de flujo LSRFortessa	BD Biosciences
Incubadores celulares	Heraeus
Irradiador Gammacell 1000	Nordion
Microcentrífuga	Hettich Lab Technology
Microscopios ópticos	Nikon
Microscopio confocal A1R Si	Nikon
Microscopio de fluorescencia Axio Imager A1	ZEISS
Nefelómetro	Siemens
Odyssey® Fc	LI-COR
Unidad de transferencia Bio-Rad	BIO-RAD
Unidades de electroforesis	BIO-RAD
Fungible de laboratorio	
Nombre	Casa comercial / proveedor
Columnas MS	Miltenyi Biotec
Cristales (SDS-PAGE)	BIO-RAD
Cubreobjetos (24mm x 24mm)	HIRSCHMANN
Filtros 0,45 µm de polietersulfona	Merck Millipore
Flask	Greiner-Bio
Guantes	Sempercare
Imán MiniMACS	Miltenyi Biotec
Jeringas	BD Biosciences
Membranas de PVDF	Merck Millipore
Papel de filtro	Resma
Papel de filtro extra-grueso (SDS-PAGE)	BIO-RAD
Pipetas de plástico	Greiner-Bio
Pipetas de vidrio	HIRSCHMANN
Placas de cultivo celular (P100, P24, P48, P96 w)	Greiner-Bio
Placas de marcaje (P96 w)	Greiner-Bio
Portaobjetos	HIRSCHMANN
Puntas para micropipetas	Greiner-Bio
Soporte para imán MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Termobloque	Eppendorf
Tubos	Greiner-Bio
Unidades de filtración 0,22µm	Merck Millipore

2.7. Software

Tabla PMM2.7. Software		
Nombre	Aplicación	Compañía
AxioVisionRel 4.7	Adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia	ZEISS
Cell Quest Pro	Adquisición de datos de citometría de flujo	BD Biosciences
EndNote X7	Gestor bibliográfico	Thomson Reuters
Excel	Análisis de datos, estadística y diseño de gráficas	Microsoft
FACSDIVA	Adquisición de datos de citometría de flujo	BD Biosciences
Fiji / ImageJ	Procesamiento de imágenes de microscopía de fluorescencia	Wayne Rasband, NIH
FlowJo	Análisis de datos de citometría de flujo	Tree Star
GraphPad Prism 5	Análisis de datos, estadística y diseño de gráficas	GraphPad Software
Illustrator CS6	Diseño de figuras	Adobe Systems Incorporated
Image Studio	Adquisición y análisis de imágenes de WB	LI-COR
InDesign CS6	Maquetación y edición de texto	Adobe Systems Incorporated
NIS Elements	Análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia	Nikon
Photoshop CS6	Edición de imagen	Adobe Systems Incorporated
UCSF Chimera	Visualización y análisis de moléculas	RBVI & NIH
Word	Procesamiento de texto	Microsoft

3. Métodos

3.1. Técnicas bioquímicas

3.1.1 Nefelometría

Los niveles de C3 en plasmático se cuantificaron en suero mediante nefelometría en el Hospital Universitario La Paz (Madrid) gracias a la colaboración de Gracia Sanz, bajo la supervisión de la Dra. M. López Trascasa, y en el Hospital Universitario y Politécnico de La Fe (Valencia). Para la obtención del suero, la sangre fue recogida en tubos sin anticoagulante; una vez formado el coágulo sanguíneo a temperatura ambiente (TA), el suero se aisló tras centrifugación a 1200 x g durante 10 minutos y a 4° C.

3.1.2 ELISA

La determinación de los valores de fI en plasma se realizó gracias a la colaboración de Elena Criado, bajo la supervisión de la Dra. M. López Trascasa, en la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz. Para su cuantificación, se realizó un ELISA tipo sándwich, y los valores obtenidos se expresaron como porcentajes respecto a un conjunto de sueros humanos normales²⁰⁰.

3.1.3 SDS-PAGE y Western blot

Para analizar las proteínas presentes en las diferentes líneas celulares transformadas T o B, se realizaron análisis de Western blot. Primero se prepararon los lisados celulares mediante el uso del tampón de lisis NP-40 (Tabla PMM2.3.) según el experimento. Para la lisis, se contaron las células, se lavaron con DPBS 1X y se incubaron en el correspondiente tampón de lisis durante 30 minutos en hielo. A continuación se centrifugaron las muestras a 22000 x g durante 10 minutos a 4° C para decantar los restos de membranas celulares y obtener el lisado (sobrenadante). La cuantificación de las proteínas presentes en los lisados se realizó mediante el método de Lowry usando una recta patrón de BSA (0,0-5,0 mg/mL de BSA en tampón de lisis).

A continuación se incubaron 40 µg de proteína de cada muestra con tampón de carga Laemmli reductor 5X (que contiene β-mercaptoetanol) y agua a 95° C durante 5 minutos, y se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida al 12-15%. Para separar las proteínas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) a 100 V durante 1 hora y 40 minutos aproximadamente. Para distinguir el tamaño de las bandas, se cargó un marcador de peso molecular.

Tras la SDS-PAGE, las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF en condiciones semi-secas durante 30 minutos a 25 V y 1.0 A.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se incubó en solución de bloqueo Odyssey® diluida 1:2 en DPBS 1X durante 1 hora a TA en agitación.

Transcurrido el tiempo de bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-Tween con 10% de solución de bloqueo Odyssey® en agitación, durante toda la noche, (*overnight*, O/N) a 4° C. A continuación, se lavaron las membranas en TBS-Tween 3 veces a TA durante 10 minutos, y se incubaron con los anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos en TBS-Tween durante 1 hora a TA en

agitación y en oscuridad.

Tras 3 lavados de 10 minutos a TA en oscuridad, se revelaron las membranas en un aparato Odyssey® Fc, que permite revelar bandas proteicas con fluorescencia.

3.2. Técnicas de biología celular

3.2.1. Aislamiento de PBMC de sangre periférica

Los linfocitos T, B y monocitos (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en un gradiente de densidad a partir de la sangre contenida en tubos con EDTA. Para ello, inicialmente se diluyó la sangre en RPMI-1640 en proporción 1:2, y para separar las PBMC por el gradiente de densidad, se depositó cuidadosamente la sangre diluida sobre Ficoll-Paque PLUS, en proporción 2:1, de manera que la proporción final de sangre:RPMI-1640:Ficoll-Paque PLUS quedó como 1:1:1. A continuación se centrifugaron los tubos a 400 x g durante 35 minutos a TA sin freno ni aceleración, y una vez obtenida la “nube” de PBMC, se recogió y se transfirió a un nuevo tubo para lavar las células 2 veces en RPMI-1640. Tras los lavados, se contabilizó la concentración de PBMC, se apartaron los millones necesarios para los estudios de proliferación y se aislaron los monocitos de los linfocitos mediante selección positiva. La fracción negativa tras el aislamiento de monocitos (linfocitos de sangre periférica, PBL) se separó para los diferentes experimentos (inmunofenotipo linfocitario, generación de líneas transformadas y congelación).

3.2.2. Cultivos celulares

Los experimentos funcionales, así como el crecimiento de las diferentes líneas celulares usadas en este trabajo, se realizaron en condiciones de cultivo estándar, manteniendo las células en incubadores celulares a 37° C, con un 5% de CO₂, y libres de micoplasma. En todos los medios de cultivo utilizados, el FBS fue des-complementado mediante inactivación a 56° C durante 30-40 minutos.

3.2.3. Citometría de flujo extracelular

Las tinciones de citometría extracelular para determinar el inmunofenotipo linfocitario básico se realizaron en PBL aislados. Las tinciones de monocitos y células dendríticas circulantes se realizaron directamente en sangre periférica (EDTA) en colaboración con el grupo de la Dra. S. Sánchez Ramón, del Hospital Clínico San Carlos (Madrid).

Para el inmunofenotipo linfocitario básico, se tiñeron 0,25-0,3x10⁶ de PBL por cada marcaje. Una vez contados, los PBL se lavaron en DPBS 1X y se incubaron con los anticuerpos directos diluidos en DPBS 1X durante 20 minutos a 4° C. Tras la incubación, se lavaron 2 veces en DPBS 1X y se analizaron los marcajes con un citómetro de flujo.

Para el inmunofenotipo de las líneas transformadas T y B, se incluyó un paso previo de bloqueo, en el cual las células (0,2x10⁶ células por marcaje) se incubaron con suero humano diluido 1:100 en DPBS 1X.

La cuantificación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias se realizó mediante porcentajes o mediante el uso de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GEO-MFI).

En todos los casos, se utilizaron controles de isotipo adecuados para cada anticuerpo.

En las gráficas de histogramas, estos controles de isotipo (CI) se han representado como histogramas opacos de color gris, y en las gráficas de símbolos, el valor relativo que se representa corresponde al ratio entre el valor de la GEO-MFI del anticuerpo a testar y del CI ($\text{GEO-MFI relativa} = \text{GEO-MFI test} / \text{GEO-MFI CI}$).

3.2.4. Citometría de flujo intracelular

Para las tinciones intracelulares se utilizaron $0,3 \times 10^6$ células por marcaje. Se fijaron en 2% de PFA diluido en DPBS-BSA durante 45 minutos a 4°C y se permeabilizaron con un 0,5% de saponina diluida en DPBS-BSA durante 15 minutos a TA. Alternativamente, la fijación y la permeabilización se realizaron usando los kits comerciales Cytofix/Cytoperm o el Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la permeabilización, todas las incubaciones y lavados posteriores se hicieron en tampón DPBS-BSA-0,5% saponina para garantizar el acceso de los anticuerpos. Las células se bloquearon usando suero humano y suero de cabra ambos a una dilución 1:100. La detección de C3 intracelular en linfocitos T (líneas HTLV-I) y B (líneas EBV) se realizó usando varios anticuerpos monoclonales (mAb) que detectan neo-epítopos que se forman cuando la proteína C3 se activa y escinde: dos anti-iC3b/C3dg (que se unen al dominio C-terminal que queda libre en los fragmentos iC3b y C3dg tras el corte por fl; clones²¹¹ SIM320.12.2.1 y SIM320.12.3.1), y un mAb comercial (clon 2991) que detecta un epítipo que se forma en el fragmento C3a cuando se ha escindido de C3 por parte de una convertasa.

En todos los casos, se utilizaron controles de isotipo adecuados para cada anticuerpo. Como controles positivos de las tinciones intracelulares para las líneas T y B se utilizaron los anticuerpos CD46 y CD19. Cuando se emplearon anticuerpos indirectos sin conjugar se incluyó una incubación adicional con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados con el fluoróforo ficoeritrina (PE). Tras las incubaciones con el anticuerpo secundario, las células se lavaron 2 veces en DPBS-BSA-0,5% saponina y se analizaron con un citómetro de flujo.

3.2.5. Generación de células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC)

Una vez obtenidas las PBMC mediante centrifugación por gradiente de densidad (apartado PMM 3.2.1), se separaron los monocitos mediante selección positiva. Para ello, las PBMC se lavaron en DPBS 1X, se contaron y se apartaron $3,0\text{--}4,0 \times 10^6$ de PBMC para los estudios de proliferación frente a diferentes estímulos (apartado PMM 3.2.8.1). Todas las PBMC restantes se lavaron en DPBS 1X-0,5%BSA-2 mM EDTA y se incubaron durante 15 minutos a 4°C con *MicroBeads* CD14 (20 μL por cada 10^7 PBMC) para la selección positiva de monocitos. Una vez transcurrida la incubación, se lavaron 3 veces con DPBS 1X-0,5%BSA-2 mM EDTA y se resuspendieron en 500 μL de la misma disolución. Tras colocar el imán en su soporte e insertar las columnas en el imán, éstas se hidrataron con 500 μL de DPBS 1X-0,5% BSA-2mM EDTA, y a continuación se añadió la suspensión de PBMC a través de la columna, colocando un tubo en la parte inferior de la misma para la recogida de la fracción CD14 negativa. Se añadió 3 veces más la misma disolución a la columna para lavar, y se separó la fracción CD14 negativa (linfocitos) para el resto de experimentos (inmunofenotipo linfocitario

básico, generación de líneas transformadas y congelación como reserva).

Para recoger la fracción CD14 positiva (monocitos), se separó la columna del imán, se colocó un nuevo tubo debajo, se añadieron otros 500 μL de DPBS 1X-0,5% BSA-2mM EDTA, y se apretó el pulsador para empujar los monocitos hacia el tubo.

Una vez aislados los monocitos, se incubaron con RPMI completo a razón de 1×10^6 células/mL durante 5 días en RPMI completo MDDC (Tabla PMM2.3) para la diferenciación a MDDC inmaduras (iMDDC) y se añadió LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 horas más para la obtención de las MDDC maduras.

3.2.6. Generación y cultivo de líneas transformadas T y B

La transformación de linfocitos T se realizó con el virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I), que infecta preferencialmente a linfocitos T CD4^+ , por lo que se acaban obteniendo líneas puras (oligoclonales) para este linaje²¹². Para ello, una vez aislados los PBL de PBMC tras extraer los monocitos, se activaron durante 24-48 horas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de PHA-L en RPMI completo HTLV-I (Tabla PMM2.3) a una concentración final de 1×10^6 células/mL. Pasado ese tiempo, se co-cultivaron en proporción 1:1 con células MT2 previamente irradiadas a 150 Gy. El mantenimiento y pases de la línea se siguieron haciendo con RPMI completo HTLV-I y transcurrido un mes y medio aproximadamente (el tiempo es orientativo y varía según la línea celular), los linfocitos T ya se habían transformado como indicaban su tasa de crecimiento y morfología celular. Como comprobación adicional (fig. PMM1, A), se fenotiparon para los marcadores CD3, CD4, CD8 y CD25; éste último, el receptor alfa de IL-2 ($\text{IL-2R}\alpha$) se utilizó para comprobar la transformación efectiva de las líneas, pues es uno de los marcadores que primero se describieron como activados por la proteína viral Tax en células infectadas por HTLV-I^{213, 214}.

La transformación de linfocitos B se realizó con el virus de Epstein-Barr²¹⁵ (EBV). Para ello, primero se generó el sobrenadante viral que contenía el virus EBV, a partir de la línea celular productora de EBV B95-8. Se sobre-crecieron las células B95-8 en RPMI completo sin cambiar el medio, y se dejaron morir dentro del flask para que liberasen el virus al medio. Se recogieron las células, se centrifugaron a $450 \times g$ durante 6 minutos y se recogió el sobrenadante, que se filtró con filtros de 0,45 μm , se alicuotó y se congeló a -80°C hasta su uso. Una vez aislados los PBL para su transformación B, se contaron y se agruparon en 2×10^6 células, se resuspendieron en 0,5 mL de RPMI completo EBV (Tabla PMM2.3) con 20 $\mu\text{g/mL}$ de PHA-L y se repartieron en pocillos de placa P48, a razón de 2×10^6 células/pocillo. A continuación se añadió 0,5 mL de sobrenadante viral descongelado, para obtener una concentración final de 2×10^6 células/mL con 10 $\mu\text{g/mL}$ de PHA-L. El mantenimiento y pases de la línea se siguieron haciendo con RPMI completo EBV, hasta que, por la tasa de crecimiento y morfología de las células, se fenotiparon con los marcadores CD3 y CD19 para verificar que las células ya se habían inmortalizado (fig. PMM1, B).

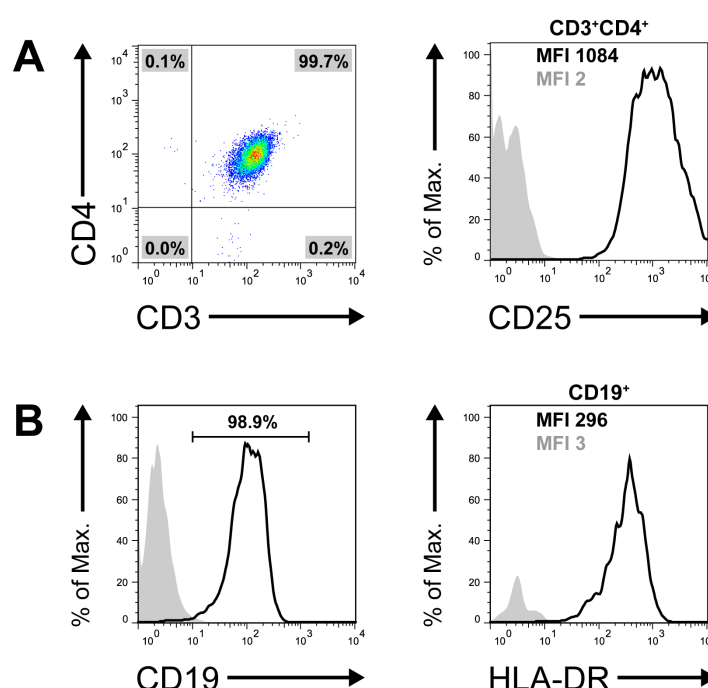


Figure PMM1. Transformed lymphocytes phenotype. **A.** HTLV-I cell line phenotype. **B.** EBV cell line phenotype. MFI corresponds to geometric mean intensity (GEO-MFI). Gray histograms represent isotype controls.

3.2.7. Microscopía de fluorescencia y confocal

Para el análisis de la localización subcelular de los fragmentos C3a e iC3b/C3dg, las células se fijaron, permeabilizaron, tiñeron y lavaron usando el kit Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set. Para el bloqueo, se incubaron con 1% de hIgG y 10% de FBS diluidos en el tampón de permeabilización del kit a 1X. Las diluciones e incubaciones con los anticuerpos también se hicieron en este tampón. Los fragmentos C3a e iC3b/C3dg se detectaron usando los mismos mAb empleados en las tinciones de citometría intracelular (apartado PMM 3.2.4). Los compartimentos subcelulares se detectaron usando varios anticuerpos policlonales de conejo: GM130 (cis-Golgi), Trans-Golgi Network 46 (trans-Golgi), EEA1 (endosoma temprano) and LAMP1 (lisosoma). Como anticuerpos secundarios, se utilizaron un anticuerpo superclonal anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 y un superclonal anti-conejo conjugado con Alexa Fluor® 555. Como controles de isotipo se emplearon IgG1 de ratón e IgG de conejo a las mismas concentraciones. Las células se montaron en portaobjetos con medio de montaje con DAPI (ProLong® Gold) y las imágenes (representada como la máxima proyección de los *Z-stacks*) se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus FV1200 (objetivo x60) en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM (CCMF), y se analizaron con el software Fiji/ImageJ (NIH, USA). Para la cuantificación de la colocalización se utilizó el parámetro *Rcoloc* o coeficiente de correlación de Pearson que proporciona el software Fiji/ImageJ.

La titulación del anticuerpo anti-C3a se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito arriba, con la diferencia de que las células se montaron con medio de montaje

con DAPI VECTASHIELD y las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Axio Imager A1 (ZEISS, objetivo x100).

Para el análisis de la expresión intracelular de C3a tras activación vía TCR, las células se analizaron antes o después de activarlas en placa (P48) durante 36 horas con 2,0 µg/mL del mAb CD3 (clon OKT3 del laboratorio de la Dra. C. Kemper). Las células se fijaron y permeabilizaron usando Cytofix/Cytoperm y se bloquearon con 10% de FBS diluido en Perm/Wash 1X. Los lavados e incubaciones con anticuerpos indirectos y secundarios también se hicieron en Perm/Wash 1X. Los fragmentos C3a, e iC3b/C3dg se detectaron usando los mismos mAb empleados en las tinciones de citometría intracelular (apartado PMM 3.2.4). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo policlonal anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488. Las células se montaron en portaobjetos con medio de montaje con DAPI (VECTASHIELD) y las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal A1R Si (Nikon, objetivo x100) en el Centro de Imagen Nikon del King's College de Londres y se analizaron con el software NIS Elements (Nikon).

3.2.8. Técnicas funcionales

3.2.8.1. Proliferación en respuesta a diferentes estímulos

Una vez aisladas las PBMC (apartado PMM 3.2.1) se apartaron $3,0-4,0 \times 10^6$ para el análisis de la proliferación celular en respuesta a diferentes estímulos. Para ello, las PBMC se resuspendieron en RPMI-1640 atemperado para obtener una concentración de $5,0 \times 10^6$ células/mL y se incubaron con 5 µM de carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) en agitación y en oscuridad durante 20 minutos a 37° C. Posteriormente se lavaron con RPMI completo frío 2 veces, se volvieron a contar y se plaquearon en una placa de cultivo de 96 pocillos (P96w) a una concentración final de $1,0-1,25 \times 10^6$ células/mL. Se cultivaron durante 5 días en RPMI completo con diferentes estímulos mitogénicos y antigénicos: 1 µg/mL de anti-CD3 pegado placa (clones UCHT-1 y OKT3), 5 µg/mL de leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), 10 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) and 1 µM de ionomicina, 8 µg/mL de mitógeno extraído de la raíz de la *Phytolacca americana* (PWM) y 10 ng/mL de superantígenos B y E (enterotoxina estafilocócica B o E, SEB, SEE). En todos los caso, se dejó un pocillo sin estimular por cada individuo.

Pasados los 5 días, se recogieron las células, se lavaron en DPBS 1X y se analizaron mediante citometría de flujo extracelular con CD3 y CD19. La dilución del CFSE se analizó como el porcentaje de células que habían proliferado en comparación con las células sin estimular (figura PMM2).

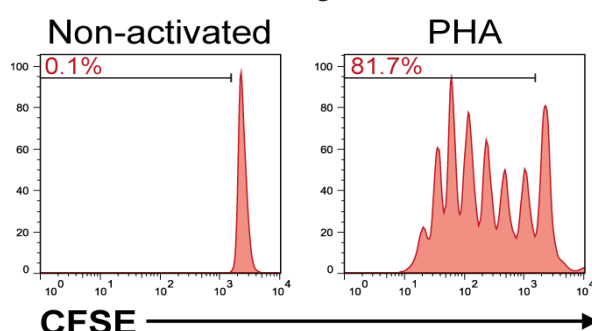


Figure PMM2. Example of proliferation analysis with CFSE. Each peak corresponds to a round of cell division. The percentage indicates the proportion of cells that proliferated at that time point.

3.2.8.2.Determinación de los títulos de anticuerpos en suero

Los títulos de anticuerpos específicos de respuesta a vacunas se determinaron gracias a la colaboración de Elena Criado, bajo la supervisión de la Dra. M. López Trascasa en la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz, con los siguientes reactivos: kit ImmunoCAP® Rc208 kit para la cuantificación de los niveles de IgG anti-toxoide tetánico, kit EIA para la detección de IgG anti-toxoide diftérico, kit de ELISA para detección de IgG anti-rubeola; kit de ELISA para detección de IgG anti-varicela, kit para la detección de IgG anti-sarampión (ver tabla PMM2.2). Los títulos de IgG anti-neumococo se midieron mediante ELISA casero usando como antígeno la neumocócica polivalente polisacárida Pneumo23®, y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano.

Los títulos de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM en suero se determinaron gracias a la colaboración de Gracia Sanz, bajo la supervisión de la Dra. M. López Trascasa en la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz.

3.3.Técnicas de biología molecular

3.3.1.Cribado de mutaciones y secuenciación génica

La detección de las mutaciones en las proteínas C3 y factor I se realizó en el laboratorio del Dr. S. Rodríguez de Córdoba y en Secugen, S.L. (CIB-CSIC) y en la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz. Para la detección de las mutaciones en el gen *C3* se siguió el protocolo descrito en Martínez-Barricarte *et al.*¹⁸² y para el cribado de las mutaciones en el gen *CFI* se siguió el procedimiento descrito en Ponce-Castro et al., 2008²⁰⁰. En la tabla PMM2.4 se detallan los cebadores utilizados para la secuenciación.

3.4.Análisis estadístico

Los resultados se representaron como nubes de símbolos sobre cajas que representan los percentiles 5, 50 y 95 del conjunto de controles, o como gráficos de barras que representan la media + ó ± la desviación estándar (SD). En algunos casos también se representaron los valores de intensidad de fluorescencia como histogramas unidimensionales. Los test estadísticos utilizados fueron la prueba de t de Student de dos colas y la prueba ANOVA de un factor con test Post-hoc de Tukey. Para cuantificar la correlación, se analizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) con un p-valor de dos colas, y se ajustó la distribución a un modelo de regresión lineal. Se consideró que los datos eran significativos siempre que el p-valor fue < 0,05 (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). El programa utilizado para los análisis estadísticos fue GraphPad Prism.

3.5.Análisis *in silico*

Para estudiar el efecto en el fenotipo (proteínas) de las mutaciones que no estaban descritas se utilizaron los software MutationTaster²¹⁶, y PolyPhen-2 (Bork Group EMBL - Biocomputing, Heidelberg, Germany).

VII. RESULTADOS

VII. RESULTADOS

1. Clasificación de los individuos analizados

Con el propósito de comparar el efecto diferencial de la ausencia de C3 en plasma sobre la biología leucocitaria se analizó una cohorte de individuos que comprendía a pacientes con deficiencia plasmática de C3, familiares sanos portadores de mutaciones en *C3* o en *CFI* (portadores sanos o *healthy carriers*, HC) y a controles (donantes sanos o *healthy donors*, HD). Los individuos analizados se clasificaron en función de tres criterios, y dada la heterogeneidad dentro de la cohorte analizada en este trabajo, se ha utilizado un código de símbolos y colores para facilitar la identificación de cada sub-clasificación (figura R1.1). Los criterios de clasificación fueron:

- El tipo de deficiencia de C3: primaria, debida a mutaciones en *C3* (triángulo) o secundaria (rombo), debida a mutaciones en *CFI*.
- La dosis génica de las mutaciones en *C3* o *CFI*: mutaciones en homocigosis (símbolo entero) o en heterocigosis (símbolo partido).
- Un umbral de 40 mg/dL de C3 en plasma establecido por la presencia de manifestaciones clínicas (pacientes). De esta forma, todos los pacientes se englobaron dentro del grupo con C3 plasmático < 40 mg/dL (símbolo rojo), mientras que los familiares sanos portadores de las mutaciones en *C3* o en *CFI* (símbolo blanco y negro) junto con los controles (símbolo cruz) se agruparon en el grupo con C3 plasmático ≥ 40 mg/dL. El rango en población sana de C3 plasmático varía entre los 75-135 mg/dL, y el de fI, entre 77-115 % con respecto a un conjunto de sueros humanos normales.

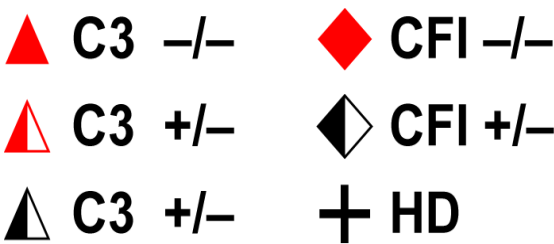


Figure R1.1. Symbols code identifying each donor group.

Así, la cohorte estudiada (figura R1.2 y Tabla R1) estaba compuesta por nueve individuos con niveles de C3 por debajo del rango de normalidad, y tres pacientes con niveles muy bajos de FI plasmático. De ellos, cuatro eran pacientes con deficiencia primaria de C3, debida a mutaciones en homocigosis (dos) y heterocigosis (dos) sobre el gen *C3*, y tres eran pacientes con deficiencia secundaria o por consumo de C3 en plasma, a causa de mutaciones en homocigosis en el regulador *CFI*. El resto eran HC heterocigotos para algunas de las mutaciones en *C3*, y además se estudió a un HC heterocigoto para una de las mutaciones en *CFI*. Los diagramas de los pedigríes (figura R1.2) mantienen el código de colores rojo/negro para identificar a los individuos afectados dentro de cada familia.

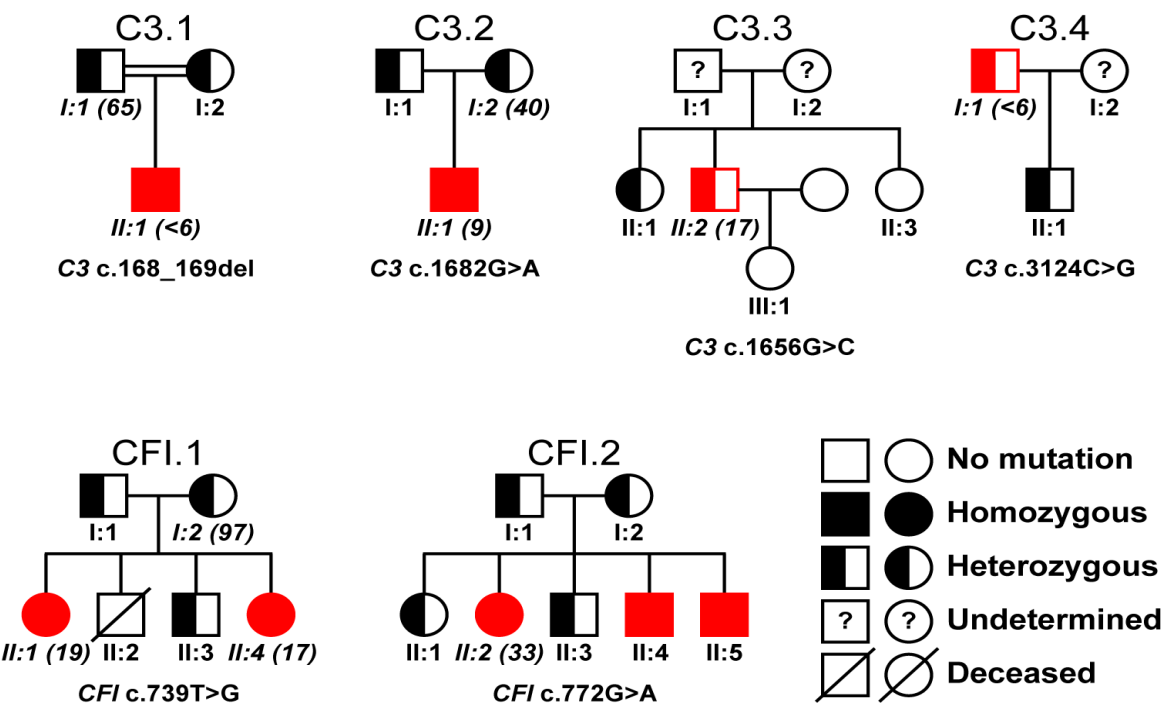


Figure R1.2. Pedigrees studied. Mutations in C3 or CFI (Factor I) are shown below each family tree. Plasma C3 values (mg/dL) of all the individuals studied (patients+HC) are shown between brackets; all symbols in red indicate members with plasma C3 < 40 mg/dL threshold with clinical features.

Las mutaciones en C3 que se encontraron en las familias con deficiencia primaria de C3 no se habían descrito previamente, mientras que las mutaciones en CFI de los deficientes secundarios de C3 ya se habían caracterizado^{196, 200}. Además de las mutaciones que se recogen en la Tabla R1, se encontraron dos polimorfismos: c.304C>G en el exón 3 de C3 (p.R102G, descrito en Botto *et al.*, 1990¹⁸⁰) en C3.1.II:1, y c.804G>A en el exón 6 de CFI (p.S268=, descrito en Vyse *et al.*, 1996¹⁹⁶) en CFI.2.II:2.

Table R1. Genetic data and plasma C3 and FI levels.										
Family			Mutation					Plasma C3		
Code	ID	Age‡	Gene	Status§	Exon	Nucleotide	Amino acid	Type¶	(mg/dL)	FI (%)
C3.1	I:1†	45	C3	+/-P	2	c.168_169del	p.V57YfsX15	F	65	ND
	II:1†	13		-/-P					< 6	76.2
C3.2	I:2†	40	C3	+/-P	13	c.1682G>A	p.G561D	M	40	ND
	II:1†	8		-/-P					9	88.0
C3.3	II:2†	35	C3	+/-P	13	c.1656G>C	p.W552C	M	17	ND
C3.4	I:1†	45	C3	+/-P	24	c.3124C>G	p.R1042G	M	< 6	ND
CFI.1*	I:2†	55	CFI	+/-S					97	ND
	II:1†	36		-/-S	5	c.739T>G	p.C247G	M	19	0.1
	II:4	26		-/-S					17	0.0
CFI.2*	II:2	50	CFI	-/-S	5	c.772G>A	p.A258T	M/Sp	33	2.4
Normal local ranges for plasma C3 or FI are 75-135 mg/dL or 77-115 % of normal human serum, respectively. Subject identification (ID) as in Fig R1.2. Red symbols denote individuals with plasma C3 < 40 mg/dL and clinical features and half-white symbols label heterozygous individuals. Black&white symbols identify HC. Triangles identify individuals with mutations in C3 and rhombuses identify individuals with mutations in CFI. Probands are in bold; *families previously described ²⁰⁰ ; †donors for whom T- (HTLV-1) and B- (EBV) lymphoblastoid cell lines were derived; ‡at date of analysis. §: +/-, heterozygous; -/-, homozygous; P, primary plasma C3 deficiency; S, secondary plasma C3 deficiency. ¶: F, frameshift; M, missense; Sp, splicing. #Mean values of 2-6 determinations in most cases. ND, not determined.										

2.Leucocitos primarios de pacientes deficientes de C3 plasmático

2.1.Inmunofenotipo leucocitario

Para estudiar el impacto de la deficiencia plasmática de C3, ya fuera primaria (por falta de síntesis de C3), o secundaria (por consumo de C3 debido a defectos en el regulador FI), se realizó un inmunofenotipo *ex vivo* mediante citometría de flujo para varias sub-poblaciones de linfocitos T y B, incluidas algunas representativas de etapas de diferenciación linfocitaria. Además, dada la importancia descrita de C3 para la biología de otros leucocitos, también se analizó el fenotipo de células dendríticas (y monocitos).

Para descartar defectos sub-poblacionales debidos a leucopenia, también se analizaron los números absolutos de linfocitos y monocitos, y en todos los casos, se encontraban dentro de los valores normales (Tabla R2.1).

Table R2.1. Absolute numbers						
			Lymphocytes† (x10 ³ /μL)		Monocytes‡ (x10 ³ /μL)	
			Age*	Normal range†	Normal range‡	
C3.1	I:1	45	2.05	0.80-3.00	0.92	0.10-0.70
	II:1	13	2.60	1.20-5.00	0.55	0.10-1.00
C3.2	I:2	40	1.00	0.80-3.00	0.58	0.10-0.70
	II:1	8	2.09	1.80-7.30	0.63	0.10-1.00
C3.3	II:2	35	2.08	0.80-3.00	0.64	0.10-0.70
C3.4	I:1	45	3.06	0.80-3.00	0.56	0.10-0.70
CFI.1	I:2	55	1.58	0.80-3.00	0.27	0.10-0.70
	II:1	36	1.64	0.80-3.00	0.46	0.10-0.70
	II:4	26	2.23	1.10-4.50	0.62	0.10-0.70
CFI.2	II:2	50	1.91	0.80-3.00	0.69	0.10-0.70

Probanda in bold. *At date of analysis. Normal ranges for total lymphocytes (†) and monocytes (‡) are age-dependent.

2.1.1.Linfocitos T

El análisis del inmunofenotipo de linfocitos T reveló que las frecuencias de las poblaciones analizadas se encontraban dentro de los valores normales. Así, las frecuencias (porcentajes) de linfocitos T, linfocitos αβ y linfocitos γδ se encontraban fundamentalmente dentro del rango formado por los percentiles 5 y 95 de un conjunto de controles sanos para cada sub-población (fig. R2.1). También se analizaron sub-poblaciones de linfocitos T CD4⁺ representativas de sucesivos pasos de diferenciación. Del mismo modo, las frecuencias observadas de emigrantes recientes tímicos (*recent thymic emigrants*, RTE; CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺), de linfocitos naíf centrales (*central naïve*, CN; CD4⁺CD45RA⁺CD31⁻) y de linfocitos memoria (CD4⁺CD45RA⁻) se encontraban mayoritariamente dentro del rango normal (fig. R2.1). En el caso concreto de los RTE, los valores de RTE que se encuentran fuera de la caja del rango control se explican por la variabilidad en la edad de la cohorte analizada, y en ninguno de los casos implicó un correlato clínico.

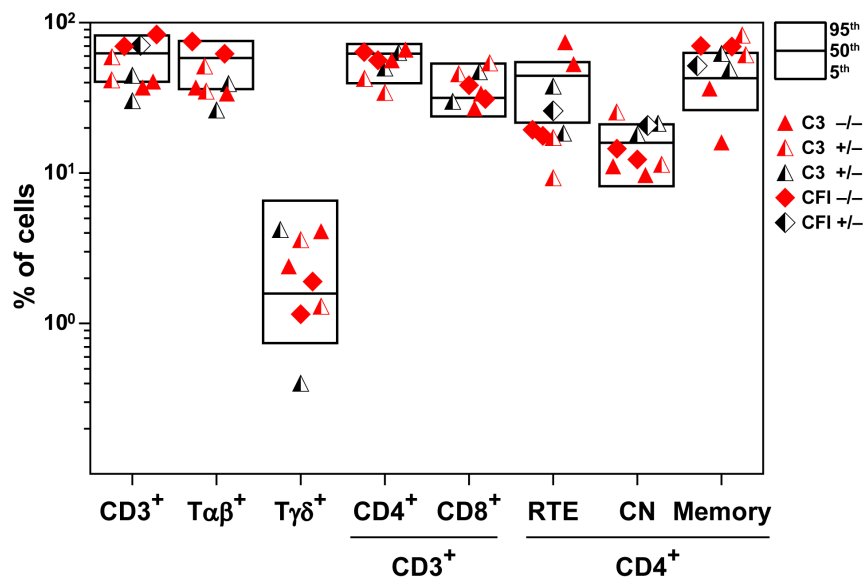


Figure R2.1. T lymphocyte immunophenotype analysis. T cell subsets distribution was compared with normal 5th, 50th and 95th percentiles (boxes; n=13 HD). Each symbol represents an individual from a single experiment. RTE, recent thymic emigrants; CN, central naïve.

El estudio de todas las sub-poblaciones de linfocitos T en función del umbral de 40 mg/dL de C3 plasmático, tampoco arrojó diferencias significativas entre el grupo con C3 ≥ 40 mg/dL, compuesto por los HD y los HC, y el grupo con C3 < 40 mg/dL, compuesto por los pacientes (fig. R2.2).

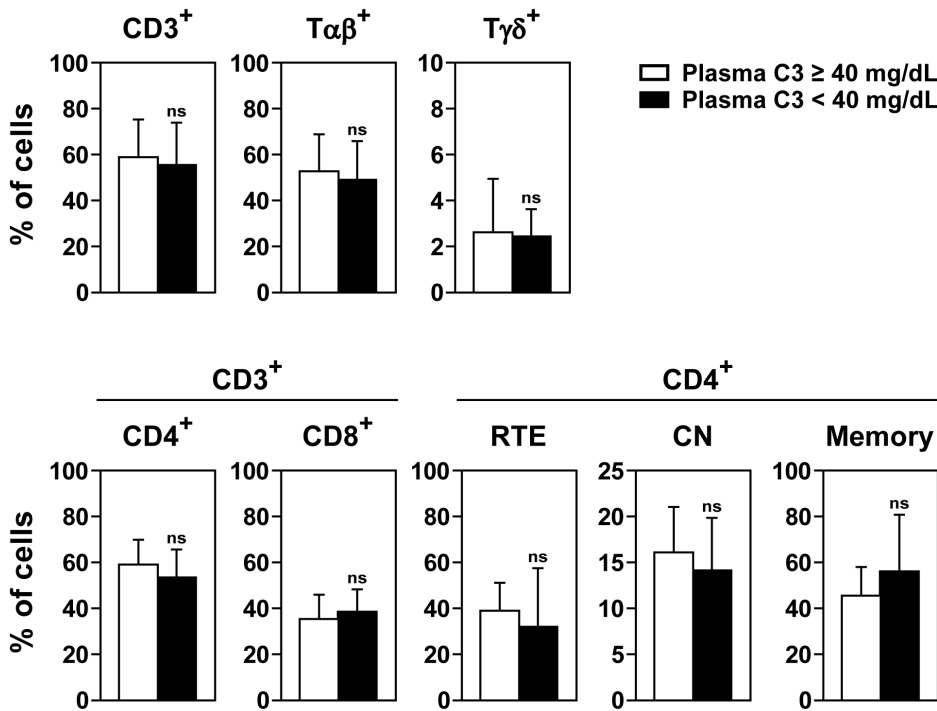


Figure R2.2. Statistical analysis comparing T cell subsets (mean+SD) of individuals below (patients) or above (HD+HC) the 40 mg/dL plasma C3 threshold. RTE, recent thymic emigrants; CN; central naïve; ns: non-significant.

Por tanto, la falta de C3 plasmático, por mutaciones en *C3* o en *CFI*, no conllevaba un defecto en el fenotipo y diferenciación de los linfocitos T.

2.1.2. Células dendríticas

Estudios previos habían descrito la importancia del papel que desempeña la proteína C3 en la diferenciación y maduración de células dendríticas *in vivo* e *in vitro*^{117, 120, 217}. Por ello, además del inmunofenotipo y diferenciación T y B, se analizó el inmunofenotipo de células dendríticas circulantes mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC), así como la diferenciación *in vitro* de DC (MDDC).

En el estudio de las DC circulantes, las mDC (BDCA1⁺BDCA2⁻) y las pDC (BDCA1⁻BDCA2⁺CD123⁺) se clasificaron como inmaduras o maduras en función de la expresión en superficie de CD86 (CD86⁻ y CD86⁺, respectivamente). Adicionalmente, se incluyó el marcador de maduración HLA-DR como forma de evaluar su potencial capacidad de presentación antigénica.

El estudio de las mDC y pDC, tanto inmaduras como maduras, en función de los percentiles 5 y 95 del conjunto de HD (fig. R2.3, A, superior) mostró que el porcentaje de mDC y pDC de todos los HC y pacientes era comparable al del grupo de HC. En cambio, la expresión de HLA-DR tanto en mDC como en pDC, se encontraba mayoritariamente por debajo del percentil 50 (mediana del grupo de HD; fig. R2.3, A, inferior). Esta disminución de la expresión de HLA-DR era significativa ($p < 0,05$) en las mDC inmaduras y maduras de los individuos con C3 plasmático < 40 mg/dL (fig. R2.3, B, inferior). Esta agrupación permitió ver que, al analizar a todos los pacientes en conjunto en comparación con los HD+HC (C3 plasmático ≥ 40 mg/dL), la frecuencia de mDC maduras también estaba disminuida significativamente ($p < 0,05$) en los individuos con C3 plasmático < 40 mg/dL (fig. R2.3, B, superior).

Por tanto, la deficiencia de C3 plasmático, primaria o secundaria, producía una disminución en la frecuencia de células dendríticas mieloides maduras en sangre periférica cuya expresión de HLA-DR era menor.

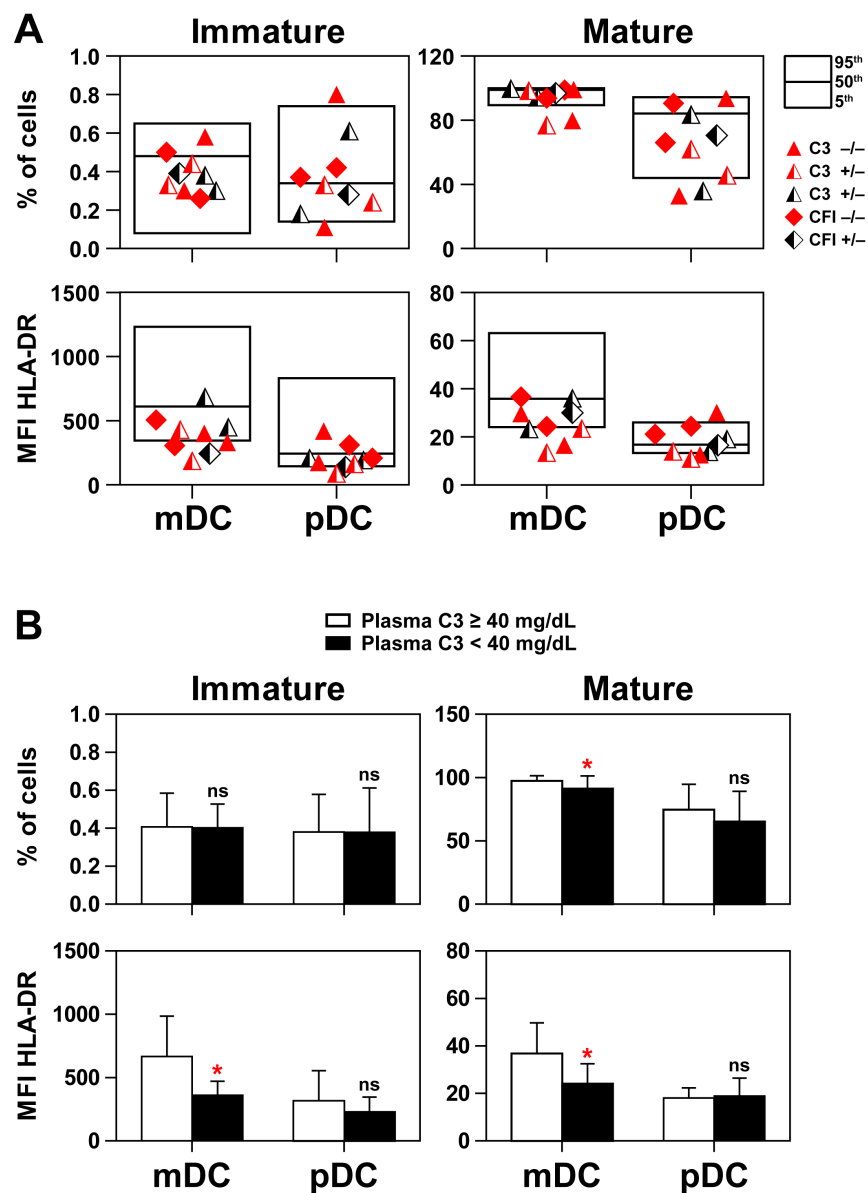


Figure R2.3. Dendritic cell subpopulations analysis. **A.** Scatter dot plots of mDC (BDCA1+BDCA2-) and pDC (BDCA1-BDCA2+CD123+) according to CD86 expression: immature (CD86-) and mature (CD86+). Boxes represent the normal 5th, 50th and 95th percentiles (boxes; n=14 HD). **B.** Statistical analysis comparing mDC and pDC subsets (mean+SD) of individuals below (patients) or above (HD+HC) the 40 mg/dL plasma C3 threshold; ns: non-significant; *p < 0.05.

2.1.2.1. Diferenciación de células dendríticas *in vitro*

Con el fin de confirmar los datos previos que demostraban que la diferenciación y maduración *in vitro* de células dendríticas (mieloides) estaba afectada en la deficiencia primaria de C3¹²⁰, se diferenciaron DC a partir de monocitos (MDDC). Para ello, se aislaron células CD14⁺ a partir de PBMC y se cultivaron durante 5 días en presencia de GM-CSF e IL-4. Estas DC inmaduras (iDC) se maduraron a DC maduras mediante activación con LPS durante 48 horas, y se analizó, tanto a 5 como a 7 días. También se

analizó el fenotipo de los monocitos circulantes a partir de los cuales se diferenciaron dichas MDDC, y no se encontraron diferencias relevantes respecto al grupo control.

Al analizar a todos los individuos en función del umbral de 40 mg/dL de C3 plasmático, no se apreciaron diferencias significativas en el número MDDC (no mostrado). El análisis de la expresión de los marcadores de diferenciación y maduración empleados, en cambio, reveló una reducción de la expresión de los marcadores CD1a, CD80, HLA-I y HLA-DR, y un aumento de la expresión de CD86, todo ello consistente tanto a 5 como 7 días, si bien es cierto que las diferencias encontradas respecto al grupo con C3 plasmático ≥ 40 mg/dL no alcanzaron significación estadística (fig. R2.4).

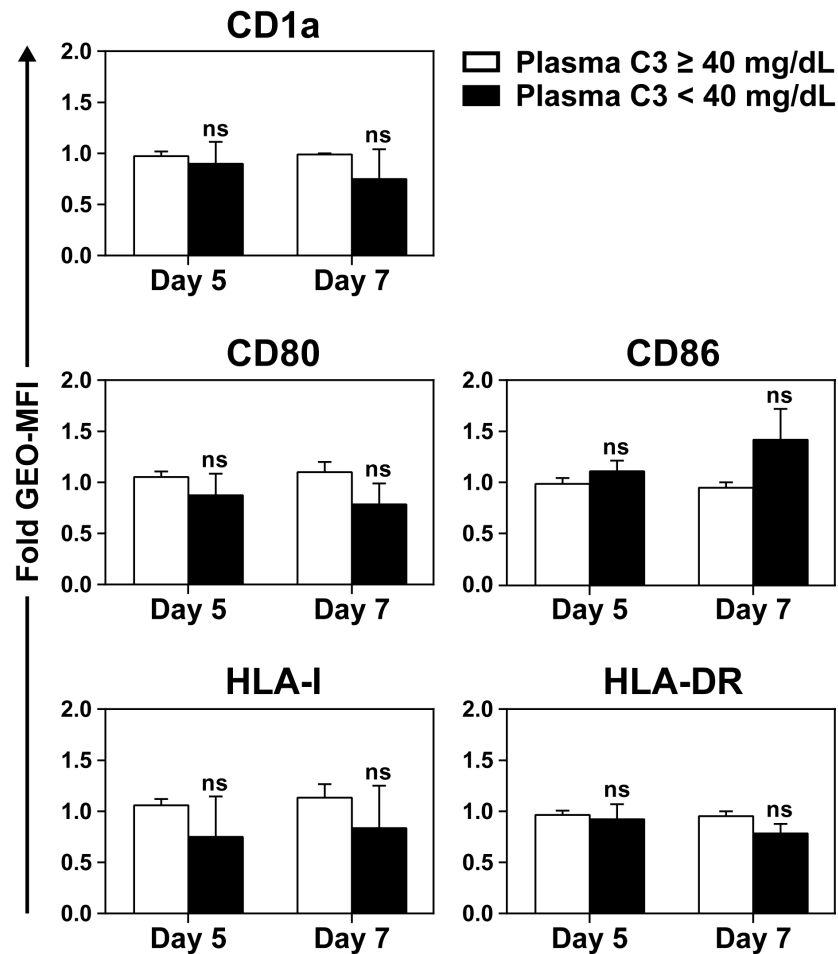


Figure R2.4. Monocyte derived dendritic cells (MDDC) analysis. Differentiation and maturation markers expression (mean+SD) relative to control from individuals with serum C3 ≥ 40 mg/dL and C3 < 40 mg/dL. Fold GEO-MFI (geometric mean of fluorescence) is referred to percentages of expression relative to HD; ns: non-significant.

Curiosamente, el estudio separado de los dos pacientes con deficiencia primaria de C3 plasmático en homocigosis mostró que dichas alteraciones eran más evidentes que agrupando a los individuos según sus niveles de C3 plasmático (fig. R2.5).

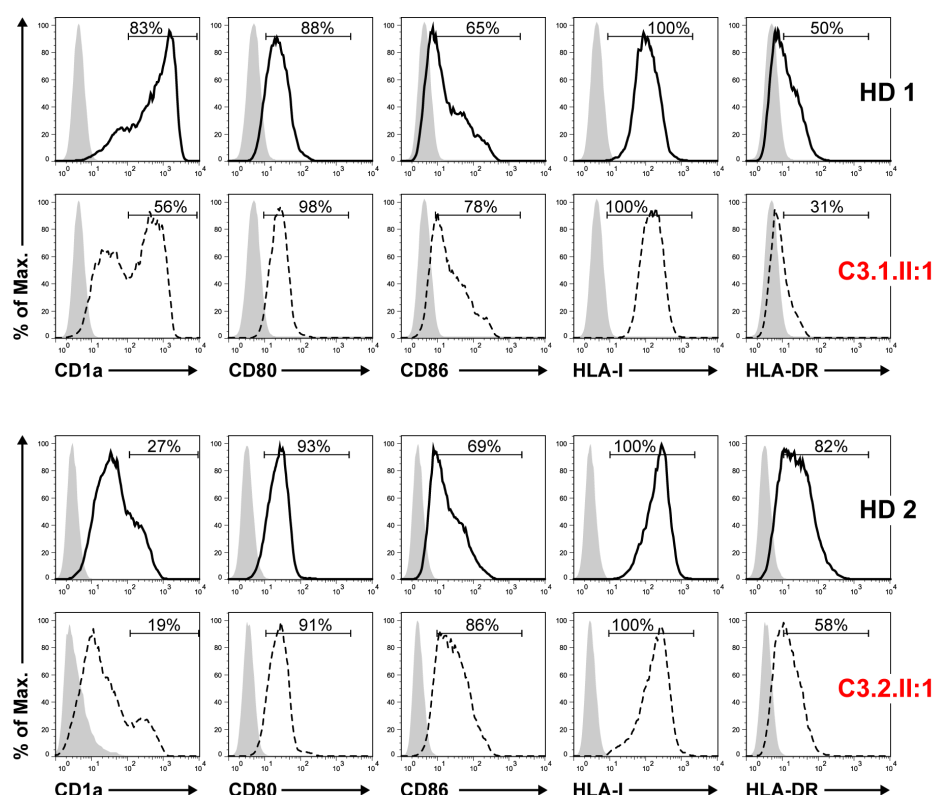


Figure R2.5. Histograms representing MDDC differentiation (5 days) and maturation markers in the two primary homozygous C3-deficient patients (C3.1.II:1 and C3.2.II:1) compared to sex and age matched healthy donor (HD1 and HD2). Gray histograms represent isotype controls.

Por tanto, los resultados obtenidos tras diferenciar *in vitro* mDC sugerían que los individuos con deficiencia de C3 plasmático tenían un defecto en la generación de MDDC a tenor de la expresión de los marcadores de diferenciación y maduración, que era más notable en los individuos con deficiencia primaria de C3.

Los defectos en la expresión del marcador HLA-DR además coincidían con los obtenidos del análisis del mismo *ex vivo* en las mDC circulantes, lo que evidenciaba que la deficiencia de C3 conlleva un potencial defecto en la capacidad de presentación antigénica de sus mDC, ya sean circulantes o diferenciadas *in vitro*.

2.1.3.Linfocitos B

Al examinar el inmunofenotipo de linfocitos B, sin embargo, se reveló un importante defecto en la diferenciación desde linfocitos B naïf (*naïve*, CD19⁺IgD⁺CD27⁻) a linfocitos B de memoria, tanto sin (*unswitched*, CD19⁺IgD⁺CD27⁺) como con (*switched*, CD19⁺IgD⁻CD27⁺) cambio de isotipo (fig. R2.6), en aquellos individuos con deficiencia primaria de C3, pero también en aquellos con deficiencia secundaria de C3.

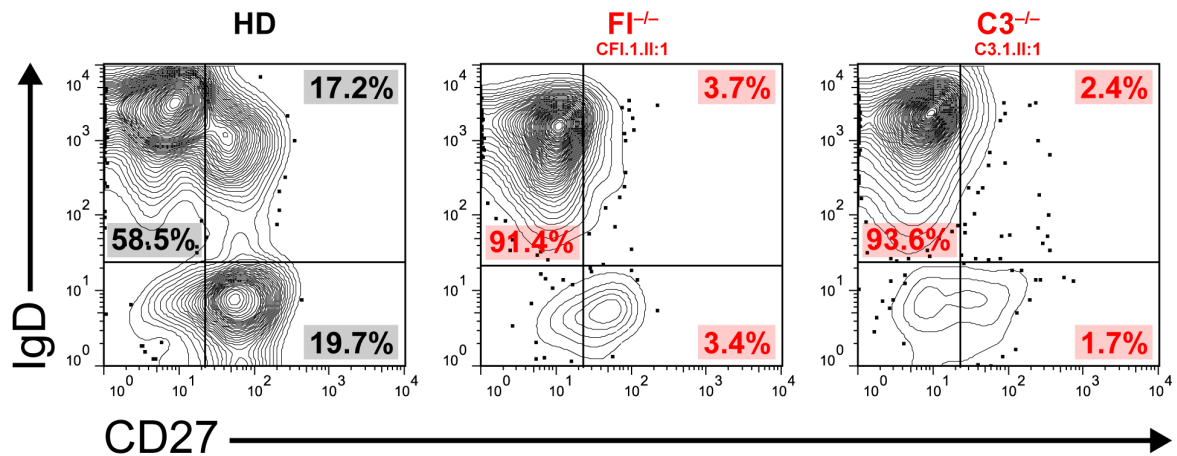


Figure R2.6. Representative B cell subsets (CD19⁺) from one HD, one FI-deficient patient and one C3-deficient patient. Numbers represent percentages of each subpopulation: CD19⁺IgD⁺CD27⁻ are naïve B cells; CD19⁺IgD⁺CD27⁺ are unswitched memory B cells; CD19⁺IgD⁻CD27⁺ are switched memory B cells.

En cambio, la frecuencia de linfocitos B totales se encontraba dentro de los rangos de normalidad establecidos por los percentiles 5 y 95 del conjunto de controles sanos (fig. R2.7).

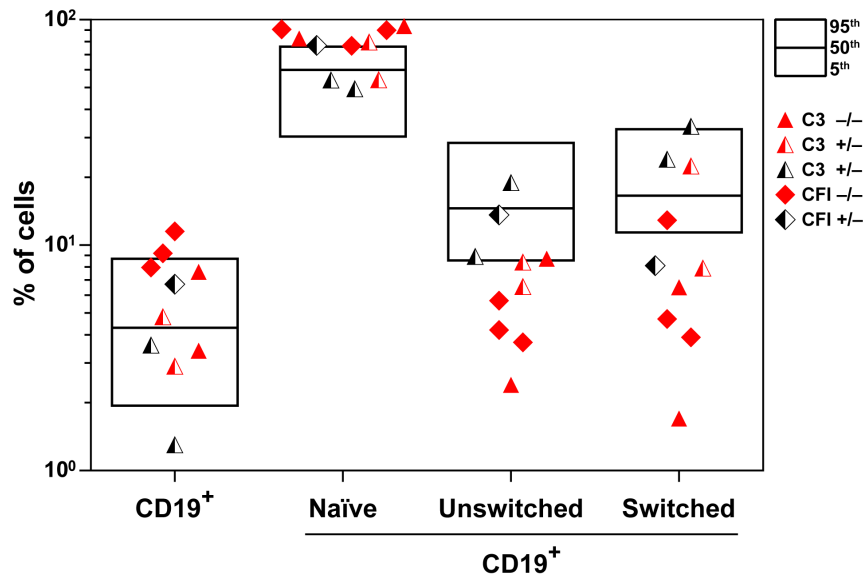


Figure R2.7. B lymphocyte immunophenotype analysis. B cell subsets distribution was compared with normal 5th, 50th and 95th percentiles (boxes; n=12 HD). Each symbol represents an individual from a single experiment.

Al analizar las sub-poblaciones de linfocitos B naíf y de memoria en función del umbral de 40 mg/dL de C3 plasmático (fig. R2.8), se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el grupo con $C3 \geq 40$ mg/dL (HD+HC), y el grupo con $C3 < 40$ mg/dL (pacientes), pero no para linfocitos B totales.

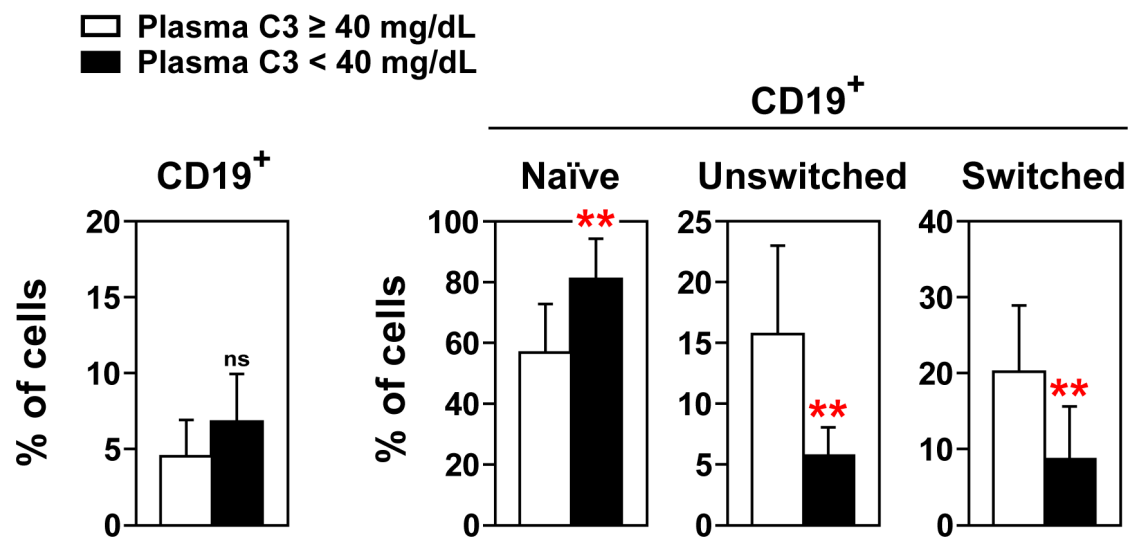


Figure R2.8. Statistical analysis comparing B cell subsets (mean+SD) of individuals below (patients) or above (HD+HC) the 40 mg/dL plasma C3 threshold. RTE, recent thymic emigrants; CN; central naïve; ns: non-significant; ** $p < 0.01$.

En consecuencia, la ausencia de C3 en plasma, ya sea por deficiencia primaria o secundaria, daba lugar a un defecto en la diferenciación de los linfocitos B de memoria.

2.2.Función linfocitaria *in vivo* e *in vitro*

Con el objetivo de estudiar si el defecto observado en la diferenciación de linfocitos B de memoria provocado por la deficiencia de C3 plasmático era debido a un defecto en la función de linfocitos T o B, se analizó la proliferación de los mismos en los pacientes con deficiencia primaria y secundaria de C3 plasmático, además de en los HC y en los HD. Para ello se cuantificó la dilución de CFSE durante 5 días como medida de la proliferación frente a diferentes estímulos (mayoritariamente T-específicos) antigénicos y mitogénicos, que incluían estímulos de membrana, como anti-CD3, superantígenos (SEE y SEB), PHA-L o PWM, y estímulos transmembrana, como PMA + ionomicina.

Los resultados mostraron que, analizando a los pacientes y HC individualmente en relación a los percentiles 5 y 95 de un grupo de HD, algunos pacientes presentaban defectos en la proliferación frente a anti-CD3, SEE y PWM (fig. R2.9).

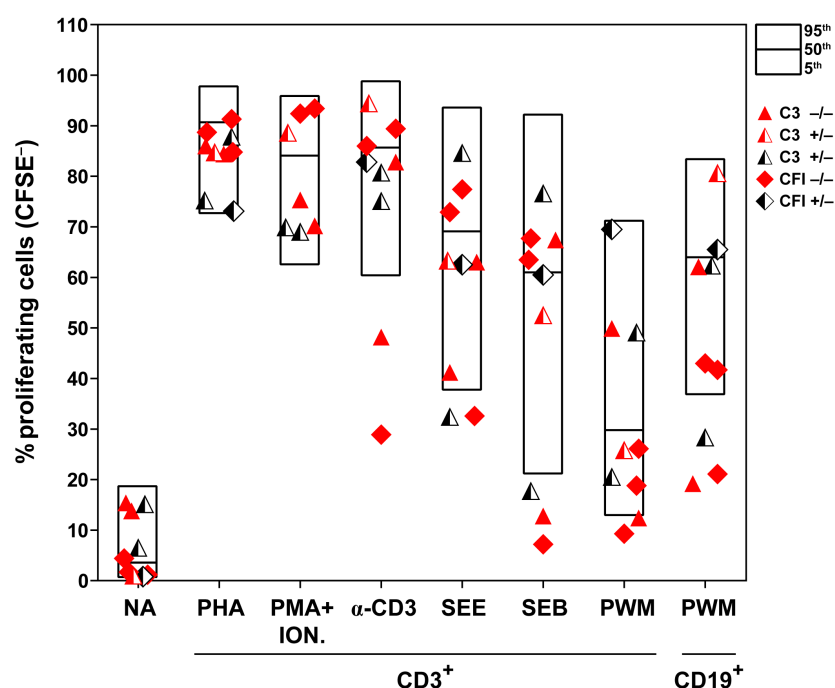


Figure R2.9. Lymphocyte proliferation in response to different stimuli. Scatter dot plots of patients and healthy carriers T (CD3⁺) and B (CD19⁺) proliferation in response to the indicated stimuli measured as % CFSE⁻ cells after 5 days compared with normal 5th, 50th and 95th percentiles (boxes; n=18 HD). NA: non-activated (no stimulus).

Sin embargo, al analizar a todos los individuos en función del umbral de 40 mg/dL de C3 plasmático, no se apreciaron diferencias significativas entre los pacientes y el grupo de HC+HD (fig. R2.10), aunque globalmente sí mostraron una leve disminución no significativa en la proliferación frente a todos los estímulos de membrana.

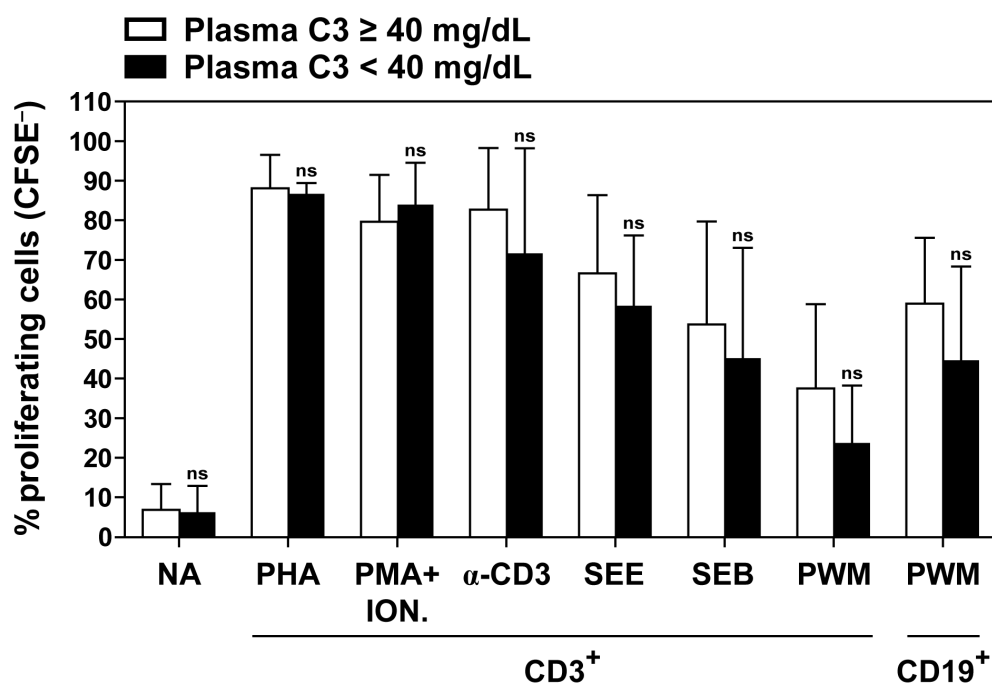


Figure R2.10. Statistical analysis comparing lymphocyte proliferation responses (mean+SD) of individuals below or above the 40 mg/dL plasma C3 threshold: patients (plasma C3 < 40 mg/dl) and HD + HC (plasma C3 ≥ 40 mg/dL); ns: non-significant.

La deficiencia (plasmática) de C3 está a menudo asociada a infecciones recurrentes, mayoritariamente bacterianas¹⁷⁴, y se han descrito títulos bajos de anticuerpos frente a vacunas que quizá proporcionan mala protección a largo plazo¹²⁰. Por ello, también se analizaron las inmunoglobulinas totales en suero (IgG, IgA e IgM), así como anticuerpos específicos frente a diferentes antígenos bacterianos y víricos (Tabla R2.2). Los títulos obtenidos para los individuos analizados, mostraron que todos ellos presentaban valores dentro de los rangos de normalidad, y por tanto, su defecto de diferenciación a linfocitos B de memoria (fig. R2.5) no correlacionaba con un defecto en la producción de anticuerpos.

En conjunto, la función de los linfocitos T y B *in vitro*, medida como proliferación en respuesta a diferentes estímulos, o la función de las células B *in vivo*, medida como niveles de inmunoglobulinas o niveles de anticuerpos específicos frente a diferentes vacunas, era esencialmente normal en nuestra cohorte, a pesar de los niveles bajos o indetectables de C3 plasmáticos de los pacientes analizados.

Table R2.2. Vaccine-specific serum immunoglobulins and specific antibodies.												
Family			Immunoglobulins				Bacteria			Virus		
Code	ID	Age*	IgG	IgA	IgM		Strep. pneumoniae	Tetanus toxoid	Diphtheria toxoid	Rubella	Varicella	Measles
C3.1	I:1	45	ND	ND	ND		14.0	16.2	0.1	—	+	+
	II:1	13	845	203	97		4.7	26.3	1.3	—	+	+
C3.2	I:2	40	ND	ND	ND		24.7	6.9	0.4	+	+	+
	II:1	8	1630	315	116		88.0	8.5	0.5	+	+	+
C3.3	II:2	35	746	230	64		ND	ND	ND	ND	ND	ND
CFL1	I:2	55	ND	ND	ND		3.6	13.9	0.3	+	+	+
	II:1	36	1130	121	233		5.4	30.1	0.2	+	+	+
CFL2	II:4	26	852	226	111		11.7	30.4	0.9	+	+	+
	II:2	50	1050	333	110		6.5	3.1	0.03	+	+	+
Normal range			725-1900 mg/dL	50-340 mg/dL	45-280 mg/dL		> 0.1 µg/mL	> 2.4 µg/mL	> 0.01 IU/mL	+	+	+
Identification (ID) as in Fig R1.2 (probands in bold). *At date of analysis. +: positive. —: negative. ND, not determined.												

2.3. Correlación entre C3 plasmático y frecuencia de subpoblaciones linfocitarias

La posibilidad de conocer los niveles plasmáticos de C3 de los individuos de nuestra cohorte, tanto de pacientes, como de HC y de algunos HD, permitió su clasificación en una serie de rangos. Como se mencionó en el primer apartado de resultados, todos los individuos con manifestaciones clínicas (pacientes) presentaban unos niveles de C3 plasmático por debajo de un umbral de 40 mg/dL. Por encima de este umbral se encontraba el conjunto de HC y HD. Atendiendo además al rango en población normal de 75-135 mg/dL de C3 plasmático, se distinguían varios grupos claros de individuos dentro de nuestra cohorte. Así, los individuos con los niveles más bajos de C3 en plasma eran aquellos con las mutaciones en homocigosis y heterocigosis en *C3*, a continuación se situaban los individuos con mutaciones en *CFI*, posteriormente los HC para las mutaciones en *C3* y en *CFI*, y por último, con los niveles más altos de C3 plasmático, los HD (fig. R2.11).

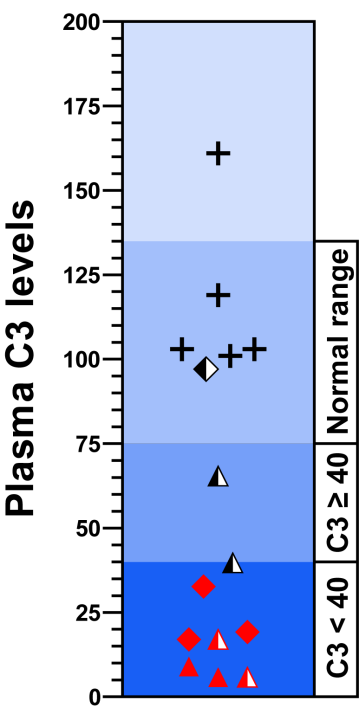


Figure R2.11. Classification of the studied cohort according to plasma C3 levels.

Tras comprobar que el defecto en la diferenciación de los linfocitos B no se asociaba a un defecto en la función B o T cuantificada como proliferación, y que dicho defecto tampoco se asociaba a unos títulos inferiores a los valores normales de anticuerpos específicos frente a vacunas ni de inmunoglobulinas totales en suero, nos planteamos si existía un rol más específico del C3 circulante que pudiera estar determinando la disminución de los linfocitos B de memoria.

Para analizarlo, se estudió la correlación que existía entre los niveles de C3 plasmático y las sub-poblaciones de linfocitos B (fig. R2.12, A) de los siete individuos deficientes de C3 plasmático (cuatro deficientes primarios y tres deficientes secundarios) y de ocho individuos suficientes para C3 plasmático (tres HC y cinco HD). Para compararlo, se analizó del mismo modo la correlación entre los niveles de C3 en plasma y las diferentes

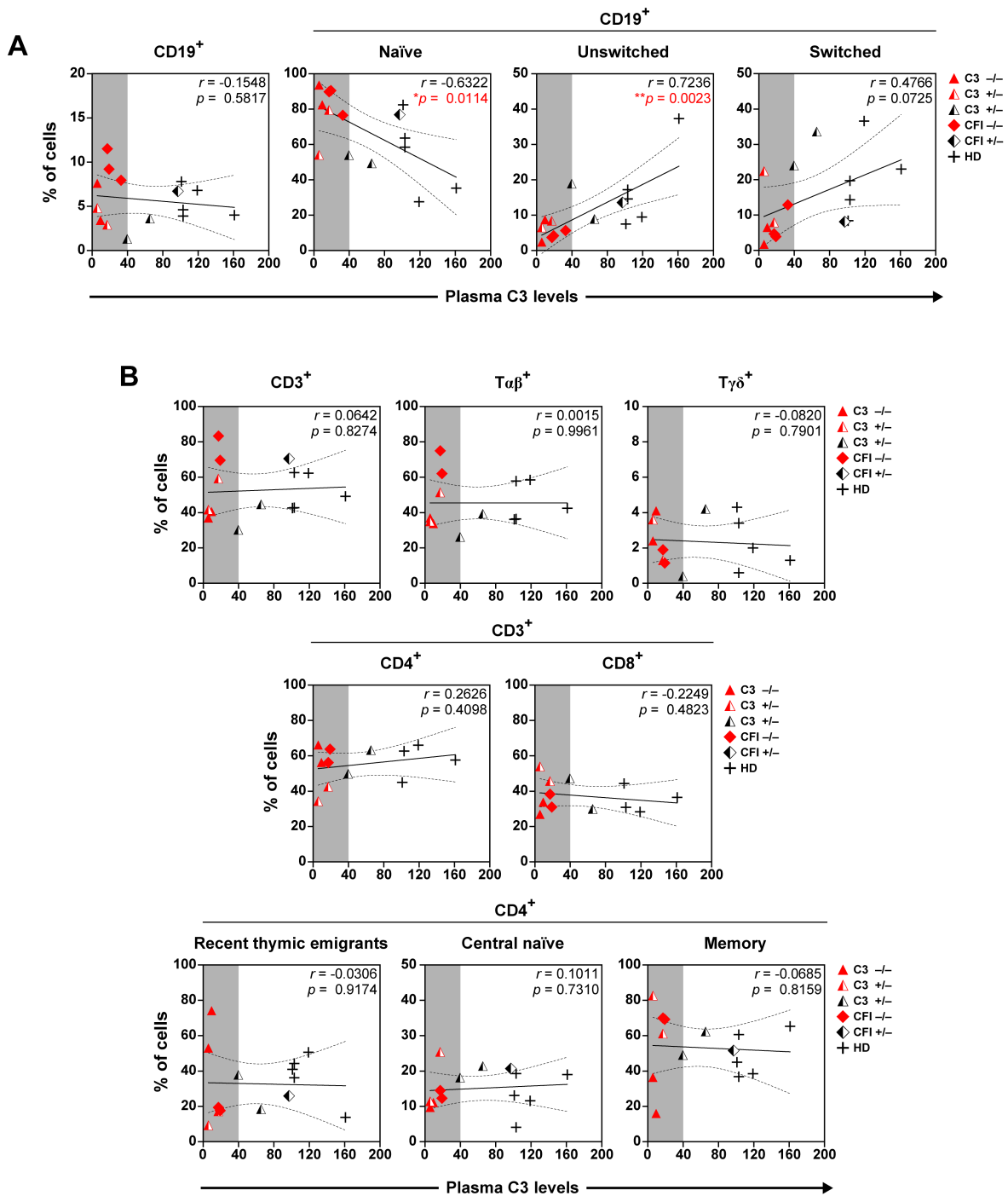


Figure R2.12. Correlation between lymphocyte subsets and plasma C3 levels. A. B cell subsets. B. T cell subsets. Data analyzed with Pearson's correlation coefficient (r). $^{*}/^{**}p < 0.05/0.01$ are highlighted in red. Solid lines are the best fit after linear regression, dashed lines are their 95% confidence intervals. Gray areas mark the < 40 mg/dL plasma C3 range. Each symbol represents an individual from a single experiment (patients: $n=7$; HC: $n=10$; HD: $n=5$).

subpoblaciones de linfocitos T (fig. R2.12, B). Los resultados revelaron que los niveles plasmáticos de C3 correlacionaban significativamente de forma positiva con la frecuencia de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo, con un coeficiente de correlación de Pearson de $r \approx 0,7$ ($**p = 0,0023$), y de forma negativa con la frecuencia de linfocitos B naíf ($r \approx -0,6$; $*p = 0,0114$); la correlación también era positiva con la frecuencia de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, a pesar de que no se alcanzase la significación estadística ($r \approx 0,5$; $p > 0,05$). En cambio, no se encontró correlación entre los niveles en plasma de C3 y la frecuencia total de linfocitos B. Es decir, cuanto menores eran los niveles plasmáticos de C3, mayor era la frecuencia de linfocitos B naíf acumulados, y menor la frecuencia de linfocitos B de memoria (fig. R2.12, A). Al aplicar este mismo análisis a las sub-poblaciones de linfocitos T, sin embargo, se comprobó que no existía correlación entre los niveles de C3 plasmáticos y la frecuencia de las distintas sub-poblaciones T analizadas (fig. R2.12, B).

Por tanto, los resultados mostraron que el defecto en la diferenciación a linfocitos B de memoria a partir de linfocitos B naíf, que era común a la deficiencia primaria y secundaria de C3 plasmático, podía ser cuantificable, puesto que el aumento de linfocitos B naíf y la consecuente disminución de linfocitos B de memoria era dosis-dependiente de los niveles de C3 plasmático.

3.Linfocitos transformados de pacientes deficientes de C3 plasmático

Nuestro grupo ha utilizado tradicionalmente la transformación con virus de células de pacientes con inmunodeficiencias primarias para la obtención de líneas celulares T y B estables y perdurables. Gracias a ello, es viable hacer determinados experimentos que requieren un número tal de células imposibles de obtener cuando la muestra de un paciente es escasa. Por esta razón, siempre que fue posible, se transformaron los linfocitos B y T de los pacientes, HC y HD utilizados en este trabajo.

La transformación de linfocitos T se realizó con el virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I), y con ella se acaban obteniendo líneas T CD4⁺ puras (oligoclonales²¹²), y la transformación de linfocitos B se realizó con el virus Epstein-Barr²¹⁵ (EBV; fig. PMM1).

3.1.Contenido de C3 intracelular

La descripción de un mecanismo intracelular de activación de C3⁶⁰ ha contribuido al cambio de paradigma sobre la visión del sistema de complemento como un mero mediador de la inmunidad innata. En la publicación del grupo de C. Kemper probaban la existencia de un mecanismo intracelular mediado por la proteasa CTSL por el cual se obtenían presumiblemente los fragmentos C3a y C3b intracelularmente. La presencia de fragmentos intracelulares de C3 se probaba en diferentes tipos celulares de estirpe linfoide y no linfoide, e incluso en células T CD4⁺ procedentes de pacientes con deficiencia plasmática de C3, por lo que nuestro grupo se planteó verificar la presencia intracelular de C3 en las líneas puras T CD4⁺ (HTLV-I) generadas a partir de células de nuestra cohorte. Además, dada la presencia de C3 intracelular en otros tipos celulares, también quisimos analizar el contenido en C3 de las líneas transformadas B (EBV).

Para comprobar la calidad y especificidad de los anticuerpos anti-C3 que se utilizaron, se realizaron una serie de experimentos previos.

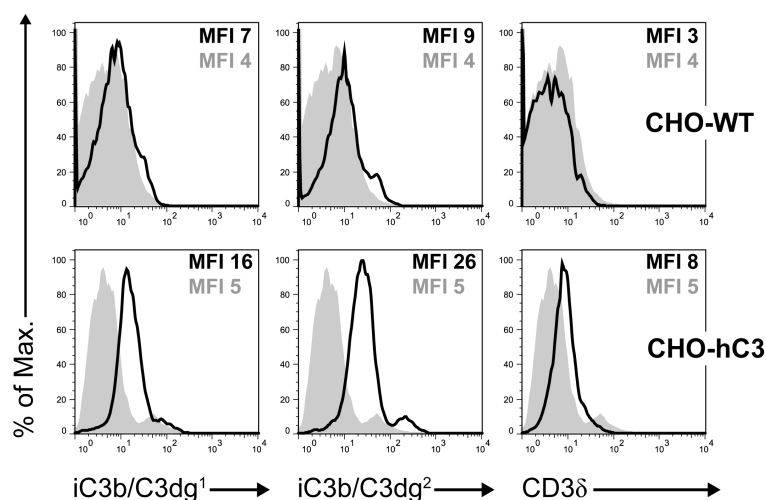


Figure R3.1. Intracellular C3 analysis in CHO cell lines. MFI corresponds to geometric mean intensity (GEO-MFI). Gray histograms represent isotype controls. iC3b/C3dg¹ and iC3b/C3dg² designate different clones of anti-iC3b/C3dg antibodies (SIM320.12.2.1 and SIM320.12.3.1, respectively, see Table PMM2.5 for more information).

En primer lugar se probaron los anticuerpos no comerciales anti-iC3b/C3dg en la línea celular epitelial procedente de ovario de hámster o CHO transfectada con C3 humano (CHO-hC3), usando una línea CHO sin transfectar (CHO-WT) como control (fig. R3.1). Como control (negativo) de tinción, se incubaron ambas líneas con el anti-CD3δ humano. Los resultados de estas tinciones demostraban que la tinción que se aprecia en la línea CHO-hC3 con los dos anticuerpos anti-C3 es específica al no aparecer en la línea CHO-WT. Además, la falta de tinción en la línea CHO-WT probaba que no se estaba produciendo una posible internalización del C3 inactivado que pueda permanecer en el FBS a pesar de su inactivación por calor.

Para validar la especificidad del anticuerpo comercial anti-C3a se realizó una titulación por citometría (no mostrado) y por microscopía de fluorescencia a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-C3a y de su correspondiente control de isotipo (fig. R3.2) en una línea HTLV-I control. Los resultados demostraron que a mayor cantidad de anticuerpo anti-C3a, mayor señal de fluorescencia se obtenía, pero no ocurría así en el control de isotipo (tanto por citometría como por microscopía), cuya fluorescencia sólo era positiva para el marcador nuclear DAPI.

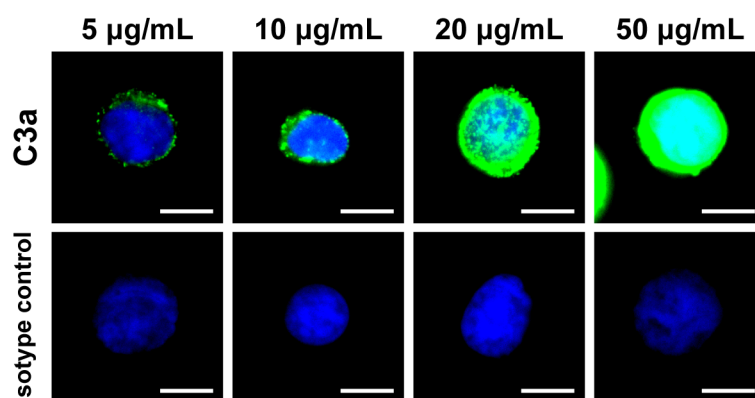


Figure R3.2. Intracellular C3a titration in HTLV-I cell line from a HD by fluorescence microscopy using human anti-C3a antibody and mouse IgG1 isotype control as primary antibodies, and Alexa Fluor® 488-conjugated (rabbit anti-mouse IgG H+L) as secondary antibody. Objective: x100; scale bars: 5 µm.

Una vez probada la funcionalidad de los anticuerpos, se analizó el contenido en C3 intracelular de las líneas T y B generadas a partir de los pacientes con deficiencia de C3 plasmático. Se eligió analizar el contenido intracelular primero en un conjunto de controles en comparación con las líneas derivadas de los pacientes cuya deficiencia plasmática de C3 era más “pura”, es decir con los individuos con deficiencia primaria de C3 debida a mutaciones en homocigosis en C3.

Mediante citometría de flujo se verificó, a través de varios experimentos independientes, que los linfocitos T transformados de los pacientes con deficiencia primaria (y en homocigosis) de C3 contenían fragmentos de C3 intracelular con unos niveles de expresión comparables a los de los controles (fig. R3.3) utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes fragmentos de C3; del mismo modo ocurría con los linfocitos B transformados (no mostrado).

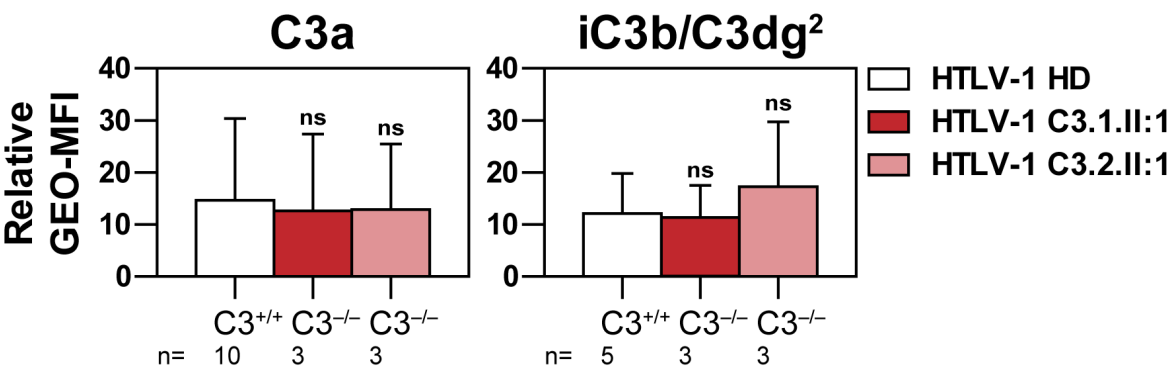


Figure R3.3. Intracellular C3 content in T cell lines from a pool of HD and the two primary homozygous plasma C3-deficient patients. Data are mean+SD of GEO-MFI relative to isotype controls; n: number of different experiments; ns: non-significant. iC3b/C3dg² designate the SIM320.12.3.1 clone of the anti-iC3b/C3dg antibody (see Table PMM2.5 for more information).

Al extender este mismo análisis al resto de líneas T y B generadas a partir de nuestra cohorte, se comprobó que las células procedentes de los individuos tanto con deficiencia primaria como con deficiencia secundaria, contenían fragmentos de C3 intracelular (fig. R3.4).

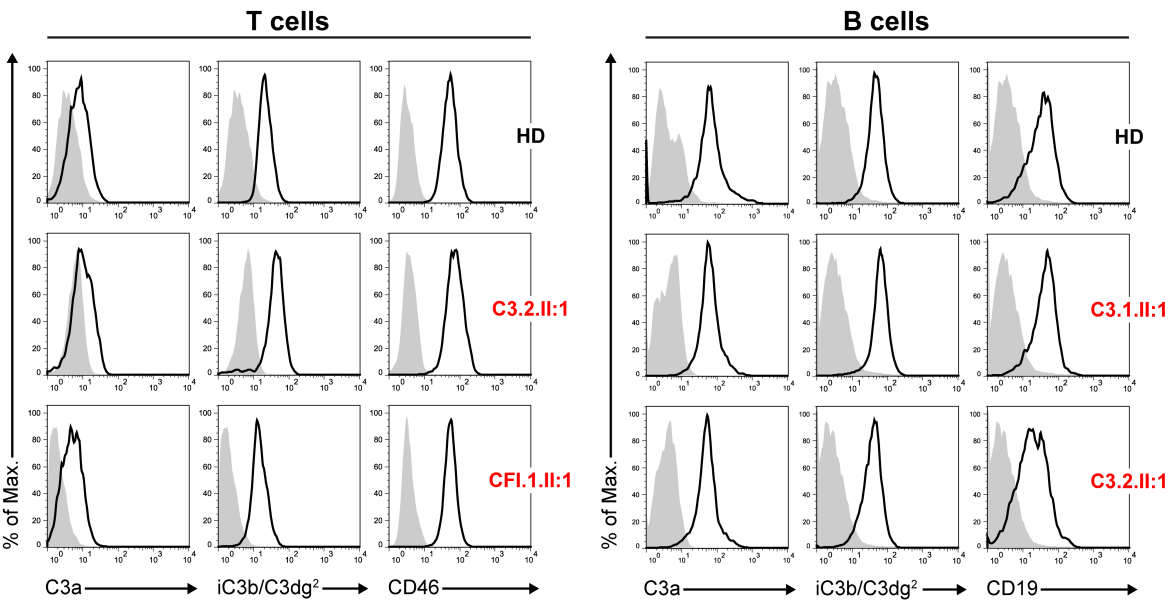


Figure R3.4. Representative intracellular C3a, iC3b/C3dg expression in T (left) and B (right) lymphoblastoid cell lines derived from the indicated primary or secondary plasma C3-deficient patients compared to isotype controls (gray histograms). Intracellular CD46 and CD19 expression were used as positive controls of the staining. iC3b/C3dg² designate the SIM320.12.3.1 clone of the anti-iC3b/C3dg antibody (see Table PMM2.5 for more information).

Además, la expresión intracelular de dichos fragmentos era comparable a la que presentaban las líneas T y B de los HC + HD (fig. R3.5).

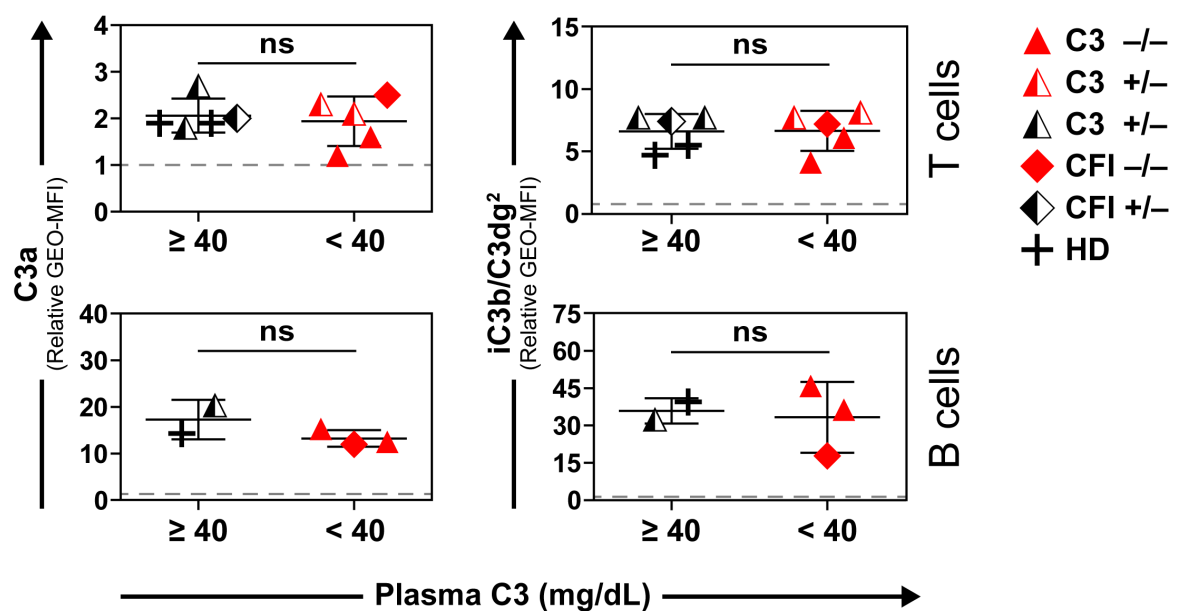


Figure R3.5. Intracellular C3 fragments in single cell lines from donors above or below the 40 mg/dL plasma C3 threshold (flow cytometry). Data are mean \pm SD of GEO-MFI relative to isotype controls (dashed lines). iC3b/C3dg² designate the SIM320.12.3.1 clone of the anti-iC3b/C3dg antibody (see Table PMM2.5 for more information); ns: non-significant.

El grupo de C. Kemper⁶⁰ probaba que tras activación vía TCR, los linfocitos T CD4⁺ aumentaban su contenido de C3 y C3a intracelular. Para verificarlo, se analizó mediante microscopía confocal la cantidad de C3a intracelular en las líneas T CD4⁺ de un HD y de los dos deficientes primarios de C3 plasmático en condiciones de no activación o tras 36 horas de activación con un anti-CD3 pegado a placa (fig. R3.6). Efectivamente, la señal de C3a intracelular obtenida en condiciones de reposo, aumentaba notablemente después de activar las líneas T vía TCR y de forma similar en las células de los deficientes primarios de C3 a la del HD.

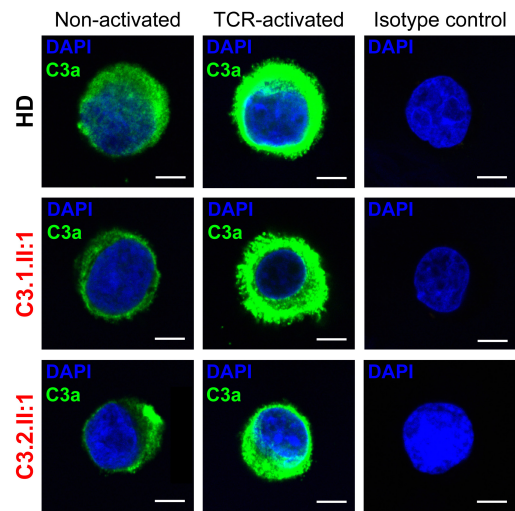


Figure R3.6. Intracellular C3a expression in T cell lines from primary plasma C3-deficient patients and a HD using mAb 2991, before (non-activated) and after TCR activation for 36 hours, measured by confocal microscopy (magnification x100).

Considerando todos los datos obtenidos en conjunto, estos resultados demostraban no sólo la presencia de fragmentos intracelulares de C3 en líneas T y B transformadas, sino que confirmaban que la deficiencia primaria de C3 plasmático no implica una deficiencia intracelular de C3, puesto que las células de todos los individuos analizados contenían fragmentos de C3 con niveles de expresión comparables a los de los controles.

3.2. Localización subcelular de C3

Una vez confirmada la presencia intracelular de diferentes fragmentos de C3 usando varios anticuerpos monoclonales, nos planteamos tratar de identificar si dichos fragmentos tenían diferentes localizaciones subcelulares. En la caracterización de la activación intracelular de C3 se confirmó que la proteasa responsable de escindir intracelularmente C3 (CSTL) se localizaba en el retículo endoplásmico, en lisosomas y en vesículas secretoras tardías derivadas de retículo endoplásmico^{60, 61}. La proteína C3 se localizaba, además de en retículo endoplásmico y en vesículas derivadas tardías de retículo, en endosomas tempranos⁶⁰, mientras que el receptor de C3a, C3aR, se localizaba en lisosomas. El conjunto de sus hallazgos ponían de manifiesto un sistema de activación intracelular de C3 en donde tras su escisión mediada por CTSL en vesículas endo/lisosomales, C3a se unía al C3aR presente en la membrana de lisosomas dando lugar a la activación necesaria para la supervivencia homeostática del linfocito T⁶³.

Sin embargo, a pesar de haber probado la presencia intracelular de C3 en células de pacientes con deficiencia plasmática de C3, no se analizaba si la localización intracelular era diferente en las células de dichos pacientes en comparación con un control.

Por ello, nosotros nos dispusimos a analizar la localización subcelular de los fragmentos C3a e iC3b/C3dg en diferentes compartimentos mediante dobles tinciones intracelulares y análisis de la colocalización mediante microscopía confocal. Para detectar los fragmentos intracelulares de C3 se utilizaron los mismos anticuerpos monoclonales empleados en los experimentos previos de citometría y microscopía (fig. R3.4-R3.6), mientras que los diferentes compartimentos que se analizaron se detectaron mediante anticuerpos policlonales que detectaban vesículas cis-Golgi (anti-GM130), vesículas de la red trans-Golgi (anti-Trans-Golgi Network 46), endosomas tempranos (anti-EEA1), y lisosomas (anti-LAMP1). Se emplearon dos líneas celulares HTLV-I (puesto que el mecanismo mencionado anteriormente fue descrito en linfocitos T CD4⁺), de un HD y de uno de los pacientes con deficiencia primaria de C3 en plasma (C3.1.II:1). La colocalización se cuantificó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r) *Rcoloc* (Fiji/ImageJ, NIH, USA), y dado que dicho coeficiente toma valores entre 0 y 1, se consideró como colocalización efectiva cuando el valor fue superior a 0,5.

El análisis de la colocalización del fragmento C3a mostró que la colocalización era muy baja con todos los compartimentos testados en los linfocitos T del HD, y según el criterio establecido de considerar colocalización efectiva sólo cuando $r > 0,5$, C3a no aparecía con esos valores en ninguno de los compartimentos subcelulares analizados (fig. R3.7, A y B); en cambio, en las células del paciente C3.1.II:1 sí se apreciaba una mayor colocalización con trans-Golgi y algo superior al HD, con cis-Golgi (fig. R3.7, A y C), pero en ambos caso no eran diferencias significativas.

Adicionalmente, tanto en paciente como en control, la colocalización de C3a con lisosomas era significativamente menor que con el resto de fragmentos (fig. R3.7, A).

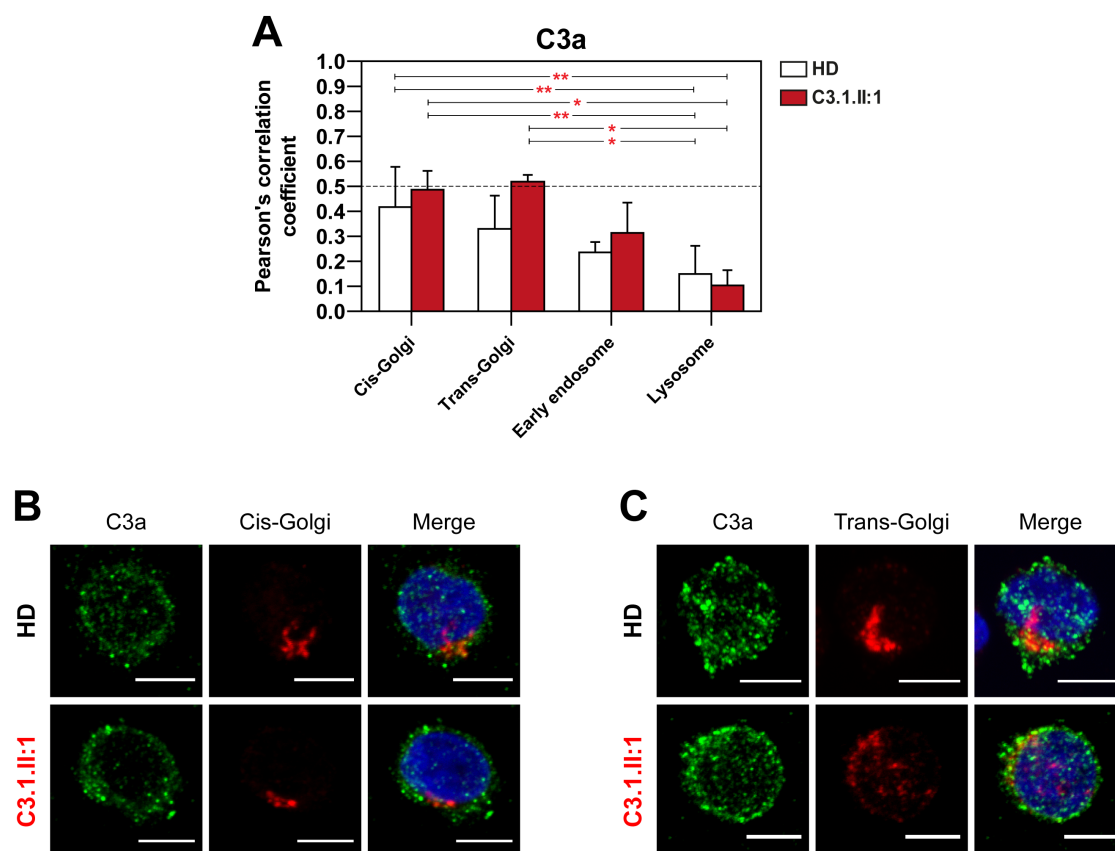


Figure R3.7. Subcellular localization of C3a fragment in T cell lines from one HD and C3-deficient patient C3.1.II:1. A. Colocalization of C3a with different subcellular compartments. $p < *0.05$, $< **0.01$. B. Confocal microscopy analysis of C3a and cis-Golgi colocalization. C. Confocal microscopy analysis of C3a and trans-Golgi colocalization. Objective: x63; scale bars: 5 μ m.

Al estudiar la localización de los fragmentos iC3b y C3dg, empleando los dos mAb disponibles, se comprobó que tanto en el HD como en el deficiente de C3 plasmático C3.1.II:1, la colocalización era significativamente mayor con las vesículas cis-Golgi (fig. R3.8, A y B) en comparación con el resto de compartimentos testados. Curiosamente, a pesar de que los dos anticuerpos van dirigidos contra los mismos fragmentos, se apreciaron diferencias en cuanto a la localización en los lisosomas entre el anti-iC3b/C3dg¹ y anti-iC3b/C3dg² entre el HD y el paciente, de forma que a nivel lisosomal, los fragmentos iC3b/C3dg se localizaban levemente en las células del paciente pero no en el HD al usar el anti-iC3b/C3dg², pero no al emplear el anti-iC3b/C3dg¹ (fig. R3.8, C).

Por tanto, el conjunto de análisis de colocalización reveló que los fragmentos iC3b y C3dg se situaban mayoritariamente en vesículas cis-Golgi. El fragmento C3a, en cambio, no parecía estar situado claramente en ninguna de los compartimentos analizados.

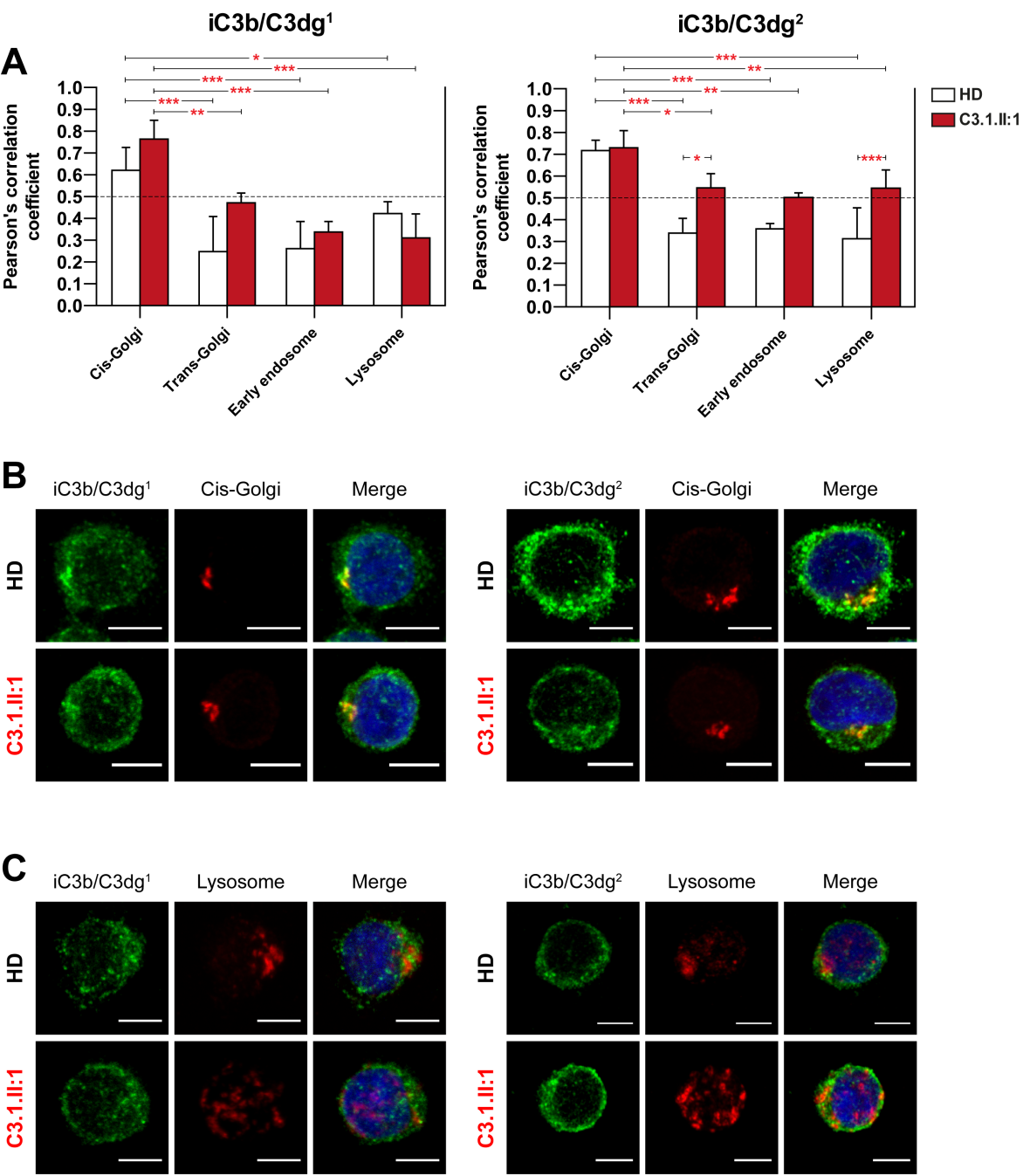


Figure R3.8. Subcellular localization of iC3b/C3dg fragments in T cell lines from one HD and C3-deficient patient C3.1.II:1. A. Colocalization of iC3b/C3dg with different subcellular compartments. $p < *0.05$, $< **0.01$, $< ***0.001$. B. Confocal microscopy analysis of iC3b/C3dg¹ and iC3b/C3dg² with cis-Golgi vesicles. C. Confocal microscopy analysis of iC3b/C3dg¹ and iC3b/C3dg² with lysosomes. Objective: x63; scale bars: 5 μ m.

Además, la mayor colocalización global de los fragmentos C3a e iC3b/C3dg con todos los compartimentos analizados en las células del paciente C3.1.II:1, sugería una mayor acumulación de C3 intracelular en las células procedentes del individuo deficiente en C3 plasmático en comparación con el control.

VIII. DISCUSIÓN

VIII. DISCUSIÓN

1. Pacientes estudiados

Con el objetivo de analizar el efecto de la falta de C3 extracelular/plasmático sobre la biología de diferentes tipos leucocitarios en esta tesis se ha comparado la deficiencia primaria de C3, debida a mutaciones congénitas en el gen *C3*, con una deficiencia secundaria o por consumo como consecuencia de mutaciones congénitas en el gen de uno de sus reguladores: *fI*.

Estudios en ratón y humanos deficientes primarios de C3 subrayan el importante papel que juegan la proteína C3 y sus fragmentos en la homeostasis, diferenciación y funciones efectoras de diferentes tipos de leucocitos, especialmente en linfocitos T, B y células dendríticas^{60, 99, 114, 120, 141}. Sin embargo, hasta ahora nadie había estudiado conjuntamente dos tipos de deficiencias de C3 plasmático etiológicamente distintas para tratar de dilucidar si la falta congénita o adquirida de C3 en plasma podrían comportarse de manera similar.

En este trabajo se ha contado con muestras procedentes de 4 familias con mutaciones en homocigosis y heterocigosis en *C3* que no habían sido reportadas hasta la fecha²¹⁸ (fig. D1.1). Dada la baja prevalencia de esta deficiencia —menos de 50 individuos reportados— se puede considerar que en este trabajo se han caracterizado lo que correspondería a un 10% de los pacientes descritos. Adicionalmente, se han aportado nuevos datos de dos familias previamente descritas con deficiencia de *fI*^{200, 210}. Aunque en esta tesis no hemos profundizado en la caracterización molecular de las consecuencias funcionales de estas nuevas mutaciones sobre la proteína C3, los análisis preliminares *in silico* han determinado que las 4 nuevas mutaciones en *C3* efectivamente tienen efectos patogénicos. Atendiendo al dominio de C3 afectado por cada mutación (fig. D1.1), una ocurre en el dominio MG1, otra ocurre al final de dominio MG5, otra al principio del dominio MG6 y la cuarta en el dominio TED, lo que concuerda en parte con datos que afirman que la mayor parte de las mutaciones *missense* en *C3* se dan en los dominios TED, MG2 y MG5. Las consecuencias funcionales de estas mutaciones en TED, MG2 y MG5 apuntan a los sitios de unión de *fH* entre los dominios TED-CUB y MG1-MG2 en la estructura cristal del complejo C3b-*fH* SCR1/4²¹⁹. A pesar de los pocos casos molecularmente bien caracterizados, se ha sugerido que los pacientes con mutaciones en la mitad N-terminal del gen de *C3* tienden a ser más susceptibles a infecciones graves¹⁷⁸, lo que coincide con el historial clínico de los pacientes C3.1.II:1, C3.1.II:1 y C3.3.II:2.

Clínicamente, todos los pacientes con deficiencia primaria de C3 plasmático han manifestado hematuria y proteinuria de diferente grado de intensidad, y de los 4, 3 exhiben GNMP, que es una de las patologías asociadas a este defecto como consecuencia de la acumulación de inmunocomplejos¹⁷⁴. Cabe destacar, que 3 de ellos también han presentado lesiones cutáneas tipo PSH y que los dos deficientes primarios por mutaciones en homocigosis (C3.1.II:1 y C3.2.II:1) han mostrado unos depósitos densos que son negativos para C3, cuya naturaleza está pendiente de ser determinada por microscopía electrónica.

En cuanto a la deficiencia secundaria de C3 plasmático, los deficientes en *fI* han

presentado una sintomatología clínica típica, con episodios de infección meningocócica. Curiosamente, una de las pacientes con esta deficiencia secundaria de C3 plasmático (CFI.1.II:I) ha sufrido episodios recurrentes de sepsis meningocócica asociados a la menstruación desde la adolescencia²¹⁰. A pesar de que se ha descrito la expresión de ciertas proteínas del complemento en el tejido endometrial como C3, fB, DAF, MCP y CR1^{220, 221}, la elevada recurrencia de episodios de meningitis asociados al periodo menstrual sugiere un mecanismo hormonal asociado a este tipo de deficiencia de complemento²¹⁰.

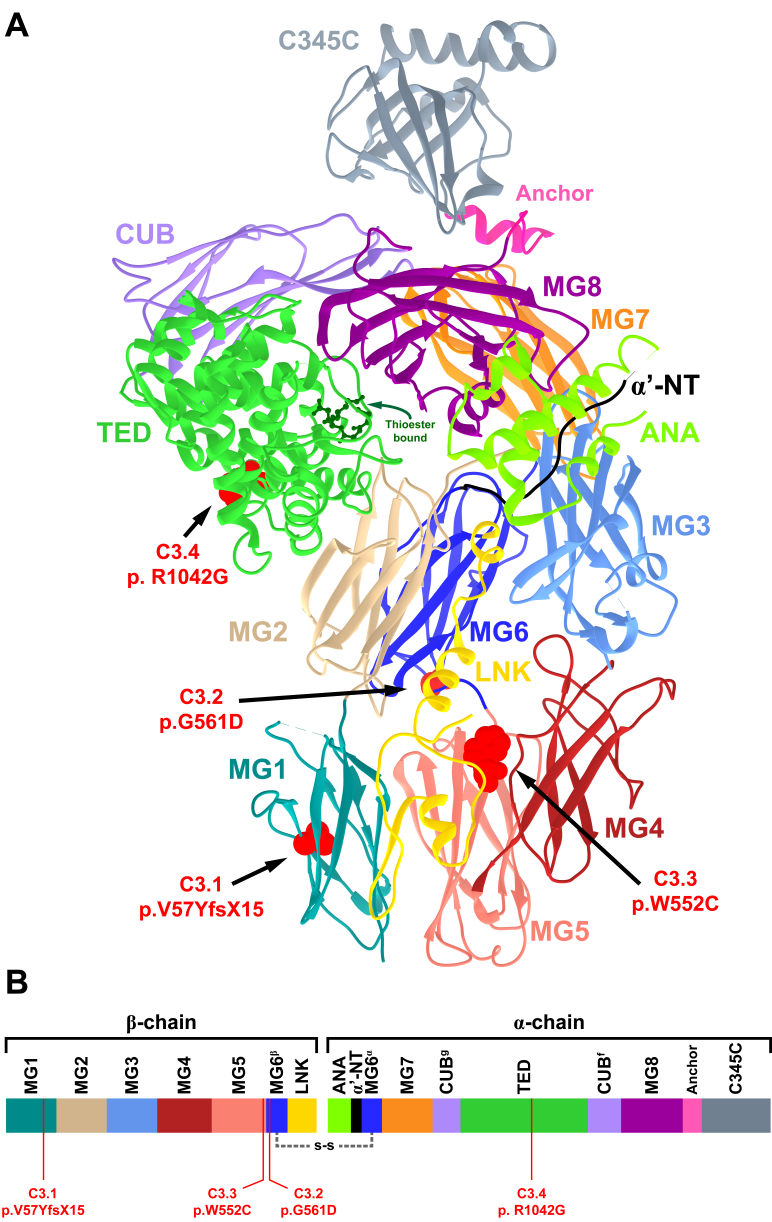


Figure D1.1. New C3 mutations localized in the molecular structure of C3. **A.** Ribbon representation of native C3 showing the found C3 mutations within their respective C3 domain. **B.** Domain sequence of C3 with the putative locations of the new C3 mutations. MG, macroglobulin domain; ANA, anaphylatoxin domain (C3a after cleavage); LNK, linker domain; TED, thioester-containing domain. Protein Data Bank #2A73; based on Janssen *et al.*, 2005¹⁶⁷ and data from this thesis.

A pesar de ser etiológicamente distintos y de presentar sintomatologías clínicas dispares, todos los pacientes analizados presentaban unos niveles muy bajos o indetectables de C3 plasmático, independientemente de si dicha disminución se debía a la ausencia/defectos funcionales en C3 (deficiencia primaria) o lo propio para fI (deficiencia secundaria de C3 plasmático).

2.Efecto diferencial de la deficiencia de C3 en el desarrollo leucocitario

Para tratar de discernir si las deficiencias primaria y secundaria de C3 plasmático afectan de forma análoga a linfocitos T, B y células dendríticas, en esta tesis se han realizado los análisis por un lado considerando a los individuos separadamente y comparándolos con un grupo de controles, y por otro, agrupando a los pacientes y HC+HD en función de un umbral de 40 mg/dL de C3 plasmático. El criterio en función de dicho umbral venía dado por la presencia de manifestaciones clínicas (pacientes); es decir, todos los pacientes presentaban un C3 plasmático por debajo de 40 mg/dL, mientras que en los HC+HD el C3 plasmático era igual o superior a ese valor (Tabla R1).

Al estudiar diferentes sub-poblaciones de linfocitos T, B y de DC hemos comprobado que la falta de C3 plasmático no tiene efectos sobre la diferenciación T. Al organizar las frecuencias de cada sub-población T en diagramas de sectores para el grupo de HD, HC y pacientes hemos comprobado que las proporciones de las diferentes sub-poblaciones estudiadas son muy similares entre los grupos de HD, HC y pacientes, con discretas diferencias en cuanto a la proporción de linfocitos RTE, T_N CD4⁺ CN y T CD4⁺ de memoria atribuibles a las diferentes edades de los individuos analizados (fig. D2.1).

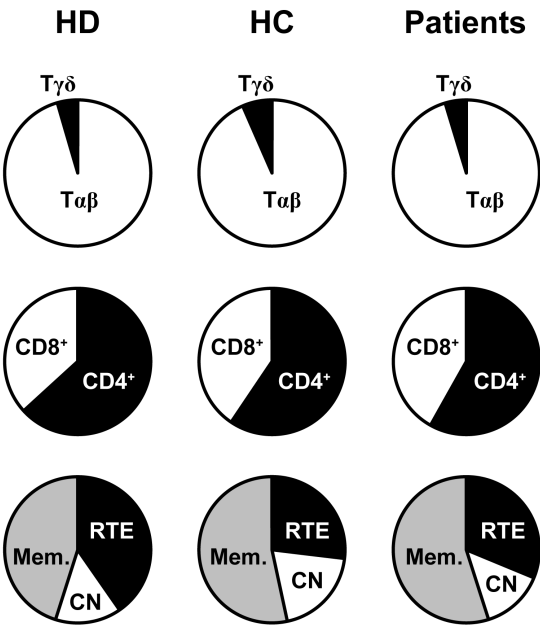


Figure D2.1. Relative proportion of several T cell subpopulations from HD, HC and patients. RTE, recent thymic emigrants; CN, central naïve CD4⁺ T cells; Mem., memory CD4⁺ T cells.

Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la ausencia de C3 plasmático tiene importantes consecuencias sobre el desarrollo y diferenciación de los linfocitos B de memoria con y sin cambio de isotipo (fig. R2.6 y fig. R2.7), puesto que tanto si la deficiencia se había producido por mutaciones en *C3* o por un consumo del C3 plasmático (por la falta de fl), la disminución significativa (fig. R2.8) en el desarrollo de los linfocitos B de memoria era similar en ambas deficiencias (fig. R2.7). Este defecto en la generación de linfocitos B de memoria es especialmente notable si se organizan las

frecuencias de cada sub-población B en diagramas de sectores para el grupo de HD, HC y pacientes (fig. D2.2). Si bien las sub-poblaciones de linfocitos B naïf y de linfocitos B de memoria se mantienen en proporciones similares en los grupos de HD y HC, en el caso de los pacientes con deficiencia de C3 plasmático los linfocitos B naïf ocupan la mayor proporción de linfocitos B totales.

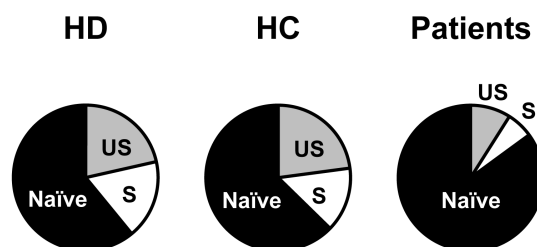


Figure D2.2. Relative proportion of naïve and memory (unswitched/US, and switched/S) B cells from HD, HC and patients.

Curiosamente, a pesar de tener estas alteraciones a nivel sub-poblacional, los pacientes con deficiencia de C3 plasmático analizados en esta cohorte no tienen linfopenia B y sus números absolutos de linfocitos totales también se encuentran dentro de los rangos de normalidad (Tabla R2.1).

Hasta la fecha, sólo se había descrito un caso en el que la deficiencia de C3 produjese un defecto en la diferenciación a linfocitos B de memoria¹²⁰. Nuestros hallazgos confirman lo publicado por Ghannam y col., pero además lo completan al exponer que independientemente de la etiología subyacente —deficiencia primaria o secundaria de C3 plasmático— la falta de C3 en plasma altera significativamente el desarrollo de linfocitos B de memoria humanos.

Dada la importancia de la opsonización de antígenos con fragmentos derivados de C3 para la correcta activación y maduración de linfocitos B de memoria^{141, 222} el hecho de que la ausencia de C3 plasmático común en ambas deficiencias conlleve un defecto de diferenciación a linfocitos B de memoria similar, sugiere que la falta de fragmentos de C3 plasmáticos disponibles para opsonizar antígenos están determinando la generación de la memoria B sub-óptima observada. Cabe destacar que, a pesar de que las mutaciones en *C3* causantes de la deficiencia primaria de C3 plasmático eran en homocigosis o en heterocigosis, la predicción *in silico* del efecto de las mismas sobre los diferentes dominios de C3 mostraba que las 4 mutaciones compartían alteraciones en los sitios de interacción de C3 con CR2, y puesto que es CR2 precisamente el receptor a través del cual se unen los fragmentos de C3 que se encuentran opsonizando antígenos, el defecto observado en la generación de linfocitos B de memoria podría estar debiéndose a una combinación de falta de fragmentos de C3 para opsonizar y de unión ineficiente de los poco que pudieran sintetizarse.

A pesar de no ser tan rotundos como los datos obtenidos en cuanto a linfocitos B, también hemos encontrado alteraciones dentro de las DC analizadas, concretamente, en las mDC y sus sinónimas diferenciadas *in vitro*, las MDDC. Hemos detectado una reducción en el número de mDC *ex vivo* que además presentaban una menor expresión

de HLA-DR (fig. R2.3). El análisis *in vitro*, ha confirmado un defecto en la diferenciación y maduración de las DC en la deficiencia de C3 plasmático en cuanto al número de MDDC diferenciadas y en cuanto a la expresión de varios marcadores de diferenciación y maduración como CD1a, CD80, HLA-I y HLA-DR¹²⁰, que era más evidente al analizar separadamente a los pacientes con deficiencia primaria por mutaciones en homocigosis en C3 (fig. R2.5). Este último dato pone de manifiesto que la deficiencia primaria y secundaria de C3 plasmático tienen el mismo efecto sobre la diferenciación de DC. No hay que olvidar que la deficiencia secundaria de C3 plasmático no implica un defecto funcional en la proteína C3 y dado que las DC son capaces de producir fragmentos de C3 que actúan a nivel autocrino para favorecer su diferenciación¹¹⁴ (fig. I2.2), nuestros datos sugieren que el hecho de observar una peor diferenciación y maduración *in vitro* de las DC de los pacientes con deficiencia primaria de C3 podría ser el reflejo de un defecto en la producción o secreción autocrina de C3 en las DC de estos pacientes, pero no en las DC de aquéllos con deficiencia secundaria de C3 plasmático.

2.1.Efecto dosis-dependiente de la deficiencia de C3 en la diferenciación, pero no la función, de los linfocitos B

A pesar de que la deficiencia de C3 plasmático se ha asociado tradicionalmente con infecciones recurrentes^{174, 179} y defectos en generación de respuestas efectoras Th1^{99, 120}, y teniendo en cuenta la sintomatología que describimos en los casos clínicos de los pacientes de nuestra cohorte, lo cierto es que ninguno de ellos ha presentado unas características clínicas sugerentes de infecciones virales, bacterianas o fúngicas realmente graves, así como enfermedad pulmonar intersticial, diarrea crónica o retraso en el desarrollo¹⁷⁸ que pudieran ser sugerentes de defectos funcionales T graves. Sin embargo, dado que en este trabajo no se han cuantificado respuestas efectoras Th1⁶⁰ es posible que el contenido intracelular de C3 en los linfocitos T de los pacientes con deficiencia de C3 plasmático que describimos en este trabajo y en otros publicados⁶⁰, permita que se desarrollen correctamente ciertas características funcionales, como la proliferación frente a estímulos, pero no todas, como ocurre con la inducción de IFN- γ y de otras respuestas efectoras Th1.

Por tanto, nuestros resultados indican que los parámetros funcionales T y B analizados, como la respuesta proliferativa a mitógenos o la respuesta de anticuerpos a vacunación, no están afectados ni en los deficientes primarios ni secundarios de C3 plasmático de este trabajo. De hecho, aunque una menor proliferación en respuesta a antígenos de recuerdo como toxoide tetánico se ha descrito en la deficiencia de C3, la respuesta proliferativa a mitógenos fue comparable a la de los controles¹²⁰. Cabe destacar que además en nuestra cohorte de deficientes en C3, la reducción en linfocitos B de memoria no se asoció con bajos títulos de anticuerpos después de la vacunación ni con bajos niveles de IgG, IgA o de IgM (Tabla R2.2) como sí ocurría con el paciente descrito por Ghannam y col.¹²⁰. Por tanto, podemos considerar que tanto en ese paciente como en los de nuestra cohorte el defecto en la diferenciación a linfocitos B de memoria podría estar ocurriendo como consecuencia de una mala activación B o de una mala cooperación con las FDC para producir la maduración de la afinidad y el cambio de isotipo dentro de los centros germinales de los órganos linfoides secundarios (fig. D2.3). En cambio, los

pocos linfocitos B de memoria o PC de vida larga que saldrían de los centros germinales serían capaces de diferenciarse correctamente y producir niveles adecuados de anticuerpos en los pacientes de nuestra cohorte (fig. I3.1, K).

En la literatura se han descrito otros casos en los que la diferenciación desde linfocitos B naíf a linfocitos B de memoria estaba disminuida pero los niveles de anticuerpos específicos eran normales, como por ejemplo en la descripción de la deficiencia de CR2/CD21¹⁵¹. Curiosamente, en las deficiencias descritas para los otros componentes del co-receptor de linfocitos B como CD19 o CD81 el defecto en la generación de memoria B sí estaba asociado a respuestas de anticuerpos defectuosas²²³⁻²²⁶. En cambio, a pesar del defecto en la generación de linfocitos B de memoria que observamos tanto en los pacientes con deficiencia primaria como secundaria de C3 plasmático, la sintomatología clínica no apunta a defectos funcionales B graves²²⁷.

Por tanto, si en nuestra cohorte el defecto en la diferenciación de los linfocitos B no se asociaba a un defecto en la función B o T cuantificada como proliferación, y visto que dicho defecto tampoco se asociaba a unos títulos inferiores a los valores normales de inmunoglobulinas totales en suero ni de anticuerpos específicos frente a vacunas, ¿era posible cuantificar si la dosis de fragmentos de C3 circulantes/plasmáticos estaba determinando el defecto en la generación de memoria B? Con esta premisa y dado que conocíamos los valores de C3 plasmático de todos los pacientes, portadores sanos así como de controles, nos dispusimos a analizar la correlación que pudiera existir entre dichos valores de C3 plasmático y la frecuencia de las diferentes sub-poblaciones T y B analizadas. El análisis de las sub-poblaciones T reveló que no existía una correlación entre la frecuencia de cada sub-población T testada y los valores de C3 de los individuos de esta cohorte. En cambio, sí existía una fuerte correlación entre los niveles de C3 plasmático y la frecuencia de linfocitos B de memoria y linfocitos B naíf (fig. R2.12): cuanto más bajos eran los niveles de C3 plasmático menor era la frecuencia de linfocitos B de memoria sin y con cambio de isotipo, y mayor era la frecuencia de linfocitos B naíf; de hecho la correlación positiva con los linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo así como la correlación negativa con los linfocitos B naíf eran estadísticamente significativas (**p = 0,0023 y *p = 0,0114, respectivamente). Esta aproximación no se había hecho hasta ahora y demuestra que el defecto en la generación de linfocitos B de memoria que vemos en nuestra cohorte de pacientes con deficiencia primaria y secundaria de C3 plasmático es dependiente de la dosis de C3 plasmático, y por extensión, de sus fragmentos, lo que supondría la aproximación más cercana en humanos para la demostración del efecto adyuvante de los fragmentos de C3 en la activación y diferenciación de los linfocitos B de memoria.

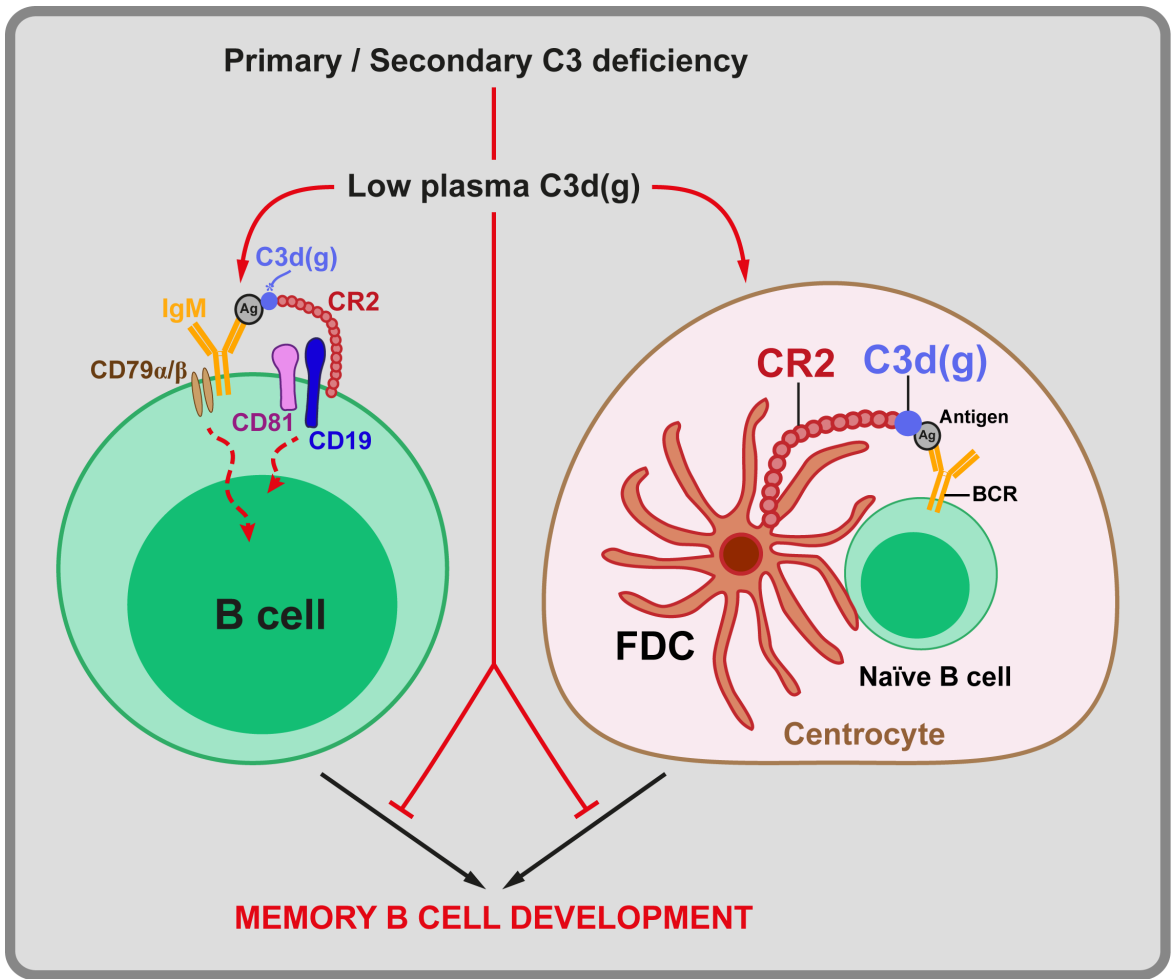


Figure D2.3. Plasma C3 deficiency (primary or secondary) triggers sub-optimal C3d(g) fragments availability, leading to a reduced B cell activation and reduced FDC co-stimulation that finally develop an impaired memory B cell memory development.

3. Activación intracelular de C3 en líneas celulares linfoblastoides

3.1. Detección de C3 intracelular en pacientes con deficiencia de C3 plasmático

A pesar de que mayoritariamente la biosíntesis de C3 tiene lugar en hepatocitos, en los últimos años se ha descrito su síntesis y secreción por otros tipos celulares^{56, 57, 60, 97}. Asimismo, la activación de C3 ha estado tradicionalmente confinada al espacio extracelular, pero recientemente han ido creciendo las evidencias sobre una activación intracelular paralela a la extracelular/plasmática. Se sabía que los linfocitos T activados con PHA o vía TCR, así como las líneas celulares transformadas con HTLV-I eran capaces de sintetizar y secretar C3 o su fragmento iC3b (Pantazis 1990; Török 2012), pero fue en 2013 cuando Liszewski y col. describieron un sistema de activación intracelular de C3 independiente de convertasas plasmáticas, de forma que la proteasa CTSL era la encargada de escindir intracelularmente C3 en C3a y C3b a partir de depósitos intracelulares de C3 de tipo endo/lisosomal⁶⁰. Mediante el uso de un inhibidor de CTSL probaban que la activación intracelular de C3 mediada por la CTSL era esencial para la supervivencia y homeostasis vía mTOR de linfocitos T CD4⁺ sin activar, y que justo tras activarlos vía TCR y CD46, los fragmentos C3a y C3b generados intracelularmente se trasladaban a la membrana celular en donde se unían a sus receptores —C3aR y CD46, respectivamente— induciéndose la síntesis de IFN- γ y la generación de respuestas efectoras Th1.

Con estas premisas y dada la experiencia de nuestro grupo en la generación de líneas celulares linfoblastoides T y B, nos planteamos que la generación de tales líneas celulares a partir de los linfocitos T y B de los pacientes con deficiencia primaria y secundaria de C3 plasmático podría aportar unas herramientas únicas para el estudio de la activación intracelular de C3. Puesto que los experimentos que demostraban esta activación intracelular estaban realizados en linfocitos T CD4⁺, recurrimos a la inmortalización con el virus HTLV-I —que preferencialmente infecta este sub-tipo T— para generar líneas puras T CD4⁺. Como además habíamos visto un claro defecto en la diferenciación a linfocitos B de memoria y puesto que la activación intracelular se demostraba en diversos tipos celulares^{60, 62}, también empleamos el virus EBV para generar líneas B linfoblastoides y analizar si el contenido intracelular en estas líneas podía aportar datos adicionales al defecto asociado a la falta de C3 plasmático.

Para el análisis de la activación intracelular de C3 empleamos tres anticuerpos monoclonales diferentes: un anti-C3a (clon 2991) y dos anti-iC3b/C3dg (clones SIM3210.12.2.1 y SIM320.12.3.1). Estos tres mAb están dirigidos frente a neo-epítopos que se forman tras la escisión del correspondiente fragmento de la molécula de C3 (fig. D3.1): el anti-C3a se une a la región C-terminal del fragmento C3a una vez que se ha liberado de la cadena α de C3; los anti-iC3b/C3dg se unen a la región C-terminal que queda libre en los fragmentos iC3b (α' de 67 kDa) y C3dg (α' de 43 kDa) tras el corte por fl. Tras comprobar la validez de los anticuerpos en líneas celulares CHO-hC3 (PMM2.1) y constatar en las líneas celulares CHO-WT que la detección intracelular de dichos epítopos era específica y que no se debía a internalización del C3 inactivado por calor que pudiera estar presente en el FBS del medio de cultivo (fig. R3.1), analizamos la expresión de dichos fragmentos en líneas T de HD y en las de los dos deficientes

primarios de C3 plasmático por mutaciones en homocigosis C3.1.II:1 y C3.2.II:1 ($n = 3-10$ experimentos independientes; fig. R3.2 y fig. R3.3). Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas en la expresión intracelular de los fragmentos/epítomos detectados por dichos anticuerpos. Al extender este análisis al resto de líneas T y a las líneas B de todos los deficientes de C3 plasmático (deficiencia primaria y secundaria) y de los portadores sanos, de nuevo se comprobó que la expresión intracelular de C3a e iC3b/C3dg en las células T y B de los individuos con deficiencia primaria o secundaria de C3 plasmático era comparable a la expresión que exhibían las células T y B de los HD+HC (fig. R3.4 y fig. R3.5), lo que pone de manifiesto que el defecto que hemos observado en diferenciación a memoria es independiente del contenido en C3 intracelular. Además también hemos confirmado los datos previos que demostraban que tras activar vía TCR estos linfocitos T la expresión intracelular de C3a aumenta⁶⁰ (fig. R3.6).

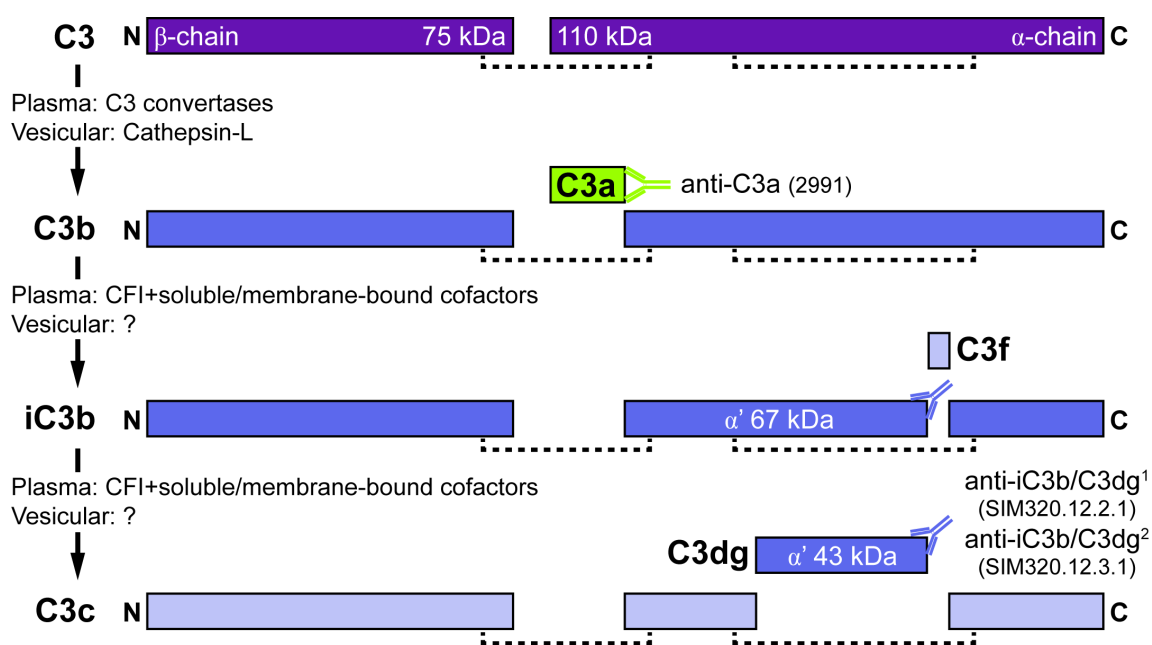


Figure D3.1. Diagram of native C3 (top) and its fragments and plasma or vesicular enzymes involved, including the binding sites in C3a, iC3b and C3dg of the indicated mAb (clones between brackets).

El hecho de que los anticuerpos empleados detecten los epítomos en C3a e iC3b/C3dg pone de manifiesto que intracelularmente se están generando unos fragmentos proteicos que, si bien no hemos sido capaces de demostrar que correspondan en peso molecular con las proteínas purificadas del plasma mediante Western blot (no mostrado), sí demostrarían que podrían estar generándose por escisión mediante convertasas alternativas a las plasmáticas. Se ha descrito una proteasa alternativa a las plasmáticas, CTSL, para el corte intracelular de C3 en C3a y C3b⁶⁰, pero la existencia de una proteasa alternativa a fl que genere los fragmentos iC3b y C3dg está pendiente de determinar. Sin embargo, nuestros resultados muestran que efectivamente también las líneas T y B procedentes de individuos con deficiencia de fl presentan expresión intracelular de los fragmentos iC3b/

C3dg, lo que descartaría la proteólisis intracelular por fl en estos individuos, e menos que, como parece ocurrir con la proteína C3, la deficiencia extracelular de fl no implique una deficiencia intracelular de fl. Por ello, sería interesante tratar de analizar el contenido intracelular de fl para tratar de verificar si, como ocurre con las DC^{94, 115, 116}, los linfocitos T y B son capaces no sólo de captar fl añadido al cultivo de forma exógena⁶⁵, sino de sintetizar un fl intracelular funcional.

Por tanto, nuestros resultados confirman aquéllos publicados previamente: los linfocitos T de los pacientes con deficiencia de C3 plasmático en los que se ha investigado la expresión intracelular de C3 contienen fragmentos intracelulares de C3^{60, 120}. Dado que otros trabajos han demostrado la síntesis y secreción de C3 intracelular en pacientes con deficiencia primaria de C3 plasmático en otros tipos celulares —tales como monocitos y neutrófilos^{120, 228, 229}— sería lógico tratar de analizar la expresión intracelular de C3 en los leucocitos del resto de pacientes deficientes primarios de C3 plasmático descritos. De repetirse nuestros hallazgos y los de los mencionados grupos se confirmaría que la deficiencia primaria de C3 plasmático —independientemente de las mutaciones que desencadenen el fenotipo en la proteína— es un defecto en la secreción extracelular de C3, subrayando la importancia de la presencia de fragmentos de C3 intracelulares para la biología de los leucocitos.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis tras el análisis de la activación intracelular de C3 en células de pacientes con deficiencia plasmática de C3, junto con los datos publicados hasta ahora en la literatura^{60, 230, 231} sugieren que la deficiencia extracelular e intracelular combinada de C3 no existe en el ser humano.

3.2. Localización subcelular de los fragmentos de C3

Tras haber determinado que las células procedentes de individuos con deficiencia primaria y secundaria de C3 plasmático contenían fragmentos de C3 cuya expresión era comparable a la mostrada por las células de los HD, nuestro siguiente paso fue tratar de averiguar en qué compartimentos típicos de las rutas de biosíntesis/exocitosis, endocitosis y reciclaje estaban los fragmentos de C3 detectados intracelularmente. Para ello, utilizamos nuestro sistema de líneas HTLV-I de un HD y del deficiente (primario) de C3 en homocigosis C3.1.II:1 (aquel con la mutación de C3 en *frameshift*, y que teóricamente debería mostrar el mayor defecto funcional en C3).

A pesar de la demostración de un mecanismo de activación intracelular de C3 en C3a y C3b mediado por la proteasa CTSL y de la demostración en otros deficientes primarios de C3 plasmático de síntesis intracelular de C3 en leucocitos^{60, 228, 229}, la fuente de los depósitos intracelulares de C3 y sus fragmentos no está bien caracterizada. Los datos de Liszewski y col. localizaban a la CTSL y a C3 en compartimentos subcelulares comunes (retículo endoplásmico y endosomas tardíos), pero también distintos (CTSL además en lisosomas, y C3 también en endosomas tempranos); el receptor de C3a, C3aR, lo localizaban en lisosomas (fig. D2.2). En la descripción de su mecanismo, el grupo de C. Kemper proponía que cuando los linfocitos T CD4⁺ se encontraban en condiciones de reposo (sin activar) tenía lugar una activación intracelular “tónica” de C3; los fragmentos C3a generados en vesículas de tipo endo/lisosomal se unían a su receptor C3aR en lisosomas, desde donde mediaban la supervivencia y homeostasis del

linfocito; tras activación vía TCR+CD46, los fragmentos C3a y C3b generados por la CTSL viajaban a la membrana, donde se unían a sus respectivos receptores (C3aR y CD46) e inducían respuesta sTh1 . Esta propuesta asumía claramente una síntesis *de novo* del C3 intracelular^{60, 97, 232}. Sin embargo, una reciente publicación por parte de este grupo identifica un nuevo mecanismo de acumulación de C3 intracelular, que tiene que ver con la endocitosis y reciclaje de fragmentos de C3, más que con la síntesis⁶⁵. Concretamente, describen que el C3 intracelular que se detecta en líneas T y B y que aumenta tras su estimulación vía TCR/BCR es concretamente la forma hidrolizada de C3, C3(H₂O), y que además, a partir de este C3(H₂O) captado y acumulado intracelularmente, se genera buena parte del C3a detectado de forma intracelular. Si bien es cierto que aparentemente estos datos pueden ser contradictorios proviniendo del mismo grupo, los autores lo resuelven postulando que los datos conjuntos de los dos estudios^{60, 65} ponen de manifiesto la existencia de dos fuentes para la acumulación de C3a intracelular, una procedente del C3(H₂O) captado, y la otra como consecuencia de biosíntesis⁶⁶.

Nuestros resultados acerca de la localización subcelular de iC3b y C3dg (fig. R3.8) demuestran que el origen intracelular de dichos fragmentos se basa en una ruta de biosíntesis o de exocitosis, más que por una ruta endocítica (fig. D2.2), puesto que hemos localizado mayoritariamente dichos fragmentos en vesículas cis-Golgi. C3a, en cambio, no parecía tener una localización clara en ninguno de los compartimentos analizados en los linfocitos T del HD (fig R3.7). En cambio, en las células del paciente deficiente (primario) de C3 en homocigosis, había una leve colocalización de C3a con vesículas trans-Golgi sin significación estadística.

Cabe destacar que en los cuatro compartimentos subcelulares analizados (cis/trans-Golgi, endosoma temprano y lisosomas), la mayor colocalización de los anticuerpos anti-C3a y anti-iC3b/C3dg ocurría en los linfocitos T procedentes del paciente con deficiencia primaria de C3 (fig. R3.7 y R3.8). Estos hallazgos, unidos a los datos publicados previamente^{120, 233}, apoyan la existencia de un defecto de exocitosis/secreción de C3. Creemos que el poco C3a que se detecta en las células del paciente presenta defectos funcionales que impiden su exocitosis y liberación al entorno extracelular; en cambio, la rápida biosíntesis intracelular de C3a en las células del HD^{60, 97} va seguida de una exocitosis, por lo que al analizar su presencia intracelular apenas se detecta señal para C3a.

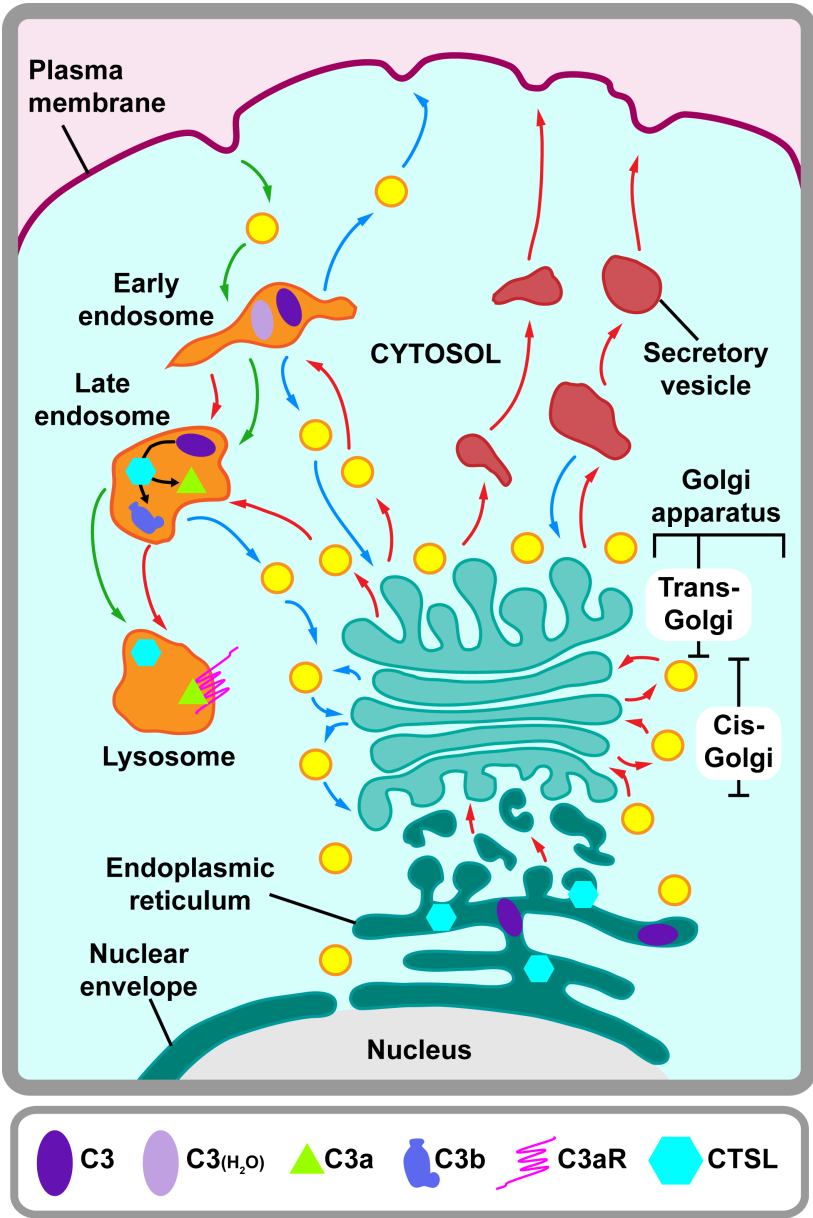
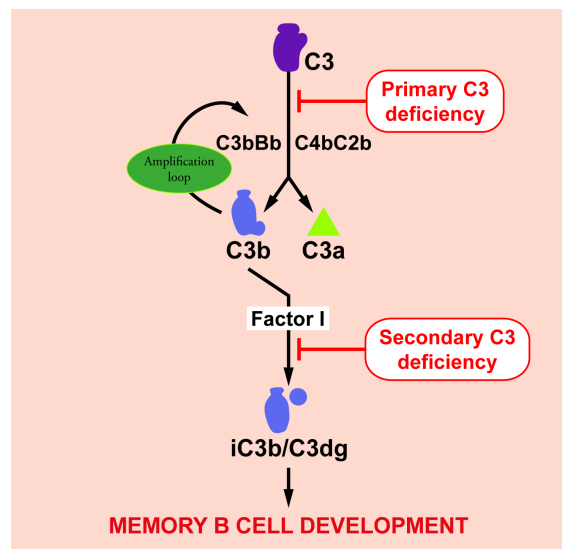


Figure D3.2. Subcellular complement localizations along vesicular trafficking combining results from this thesis and data from Liszewski *et al.*, 2013⁶⁰ and Elvington *et al.*, 2017⁶⁵. Red arrows identify biosynthetic-secretory pathways; blue arrows denote retrieval/recycling pathways; green arrows identify endocytic pathways. C3aR, C3a receptor; CTSL, cathepsin-L.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado que el C3 plasmático genera señales indispensables para el desarrollo de los linfocitos B de memoria, que el C3 intracelular no puede restaurar. Los experimentos realizados en las líneas celulares T y b linfoblastoides han confirmado la presencia de un mecanismo de activación intracelular de C3 diferente al extracelular y sostienen un defecto de la exocitosis en la deficiencia de C3 plasmático (fig. D2.3).

EXTRACELLULAR C3 ACTIVATION



INTRACELLULAR C3 ACTIVATION

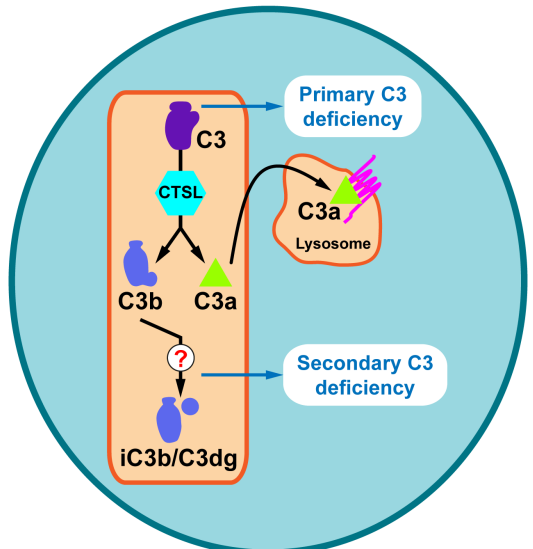


Figure D3.3. Impact of plasma C3 deficiency in leukocyte differentiation and function. Plasma C3 generates critical signals for the development of memory B, but not T, lymphocytes, which intracellular C3 cannot replace; and primary plasma C3 deficiency is not associated to an equivalent intracellular C3 fragment deficiency in lymphocytes.

IX. CONCLUSIONS

IX. CONCLUSIONS

1. Impact of plasma C3 deficiency in leukocyte differentiation and function

1. Four families with primary plasma C3 deficiency due to *C3* mutations and two families with secondary plasma C3 deficiency due to *CFI* mutations were characterized.
2. The T cell differentiation immunophenotype was normal in both primary and secondary plasma C3 deficiencies.
3. In contrast, both C3 deficiencies shared impaired naïve to memory B cell differentiation, with reduced unswitched and switched memory B cells and increased naïve B cells. This B cell differentiation impairment correlated in a dose-dependent manner with plasma C3 levels.
4. Ex vivo T and B cell function, measured as proliferation against different stimuli, and in vivo B cell function —measured as immunoglobulin or vaccine-specific antibody levels— were normal in both primary and secondary plasma C3 deficiencies.
5. Myeloid (BDCA1⁺BDCA2⁻), but not plasmacytoid (BDCA1⁻BDCA2⁺CD123⁺), dendritic cells were reduced in both primary and secondary plasma C3 deficiencies, and showed low HLA-DR expression.

2. Intracellular C3 activation in lymphoblastoid cell lines

1. Transformed T and B cell lines from secondary, and unexpectedly also primary, plasma C3 deficiency patients stained intracellularly as healthy C3-sufficient donors with a C3a- and two different iC3b/C3dg-specific monoclonal antibodies, supporting fl-independent cleavage.
2. Subcellular localization studies using exocytosis (cis/trans-Golgi) and endocytosis (early endosome) markers in T cell lines from plasma C3 deficiency patients and healthy donors supported an exocytosis rather than endocytosis pathway for intracellular C3. In addition, iC3b/C3dg, but not C3a, was more prominent in cis-Golgi vesicles, supporting their differential proteolytic origin.
3. T cell lines from plasma C3-deficient patients showed accumulation of all C3 tested fragments in several subcellular compartments, particularly in lysosomes, relative to healthy donors, supporting impaired exocytosis of C3.

Taken together, our results showed that (i) plasma C3 generates critical signals for the development of memory B, but not T, lymphocytes, which intracellular C3 cannot replace; and (ii) primary plasma C3 deficiency is not associated to an equivalent intracellular C3 fragment deficiency in lymphocytes.

X. ABSTRACT

X. ABSTRACT

Primary C3 deficiency is an extremely rare autosomal-recessive inherited disease, with less than 50 patients described worldwide. Plasma (extracellular) C3 and intracellular C3 are BCR and TCR costimulators, respectively, but their relative contribution has remained difficult to dissect, particularly in humans. We sought to study the impact of C3 signals in leukocytes through the analysis of primary (due to C3 mutations) and secondary (due to complement Factor I mutations) plasma C3-deficient patients and healthy mutation carriers. We reasoned that studying leukocyte differentiation and function comparatively in primary versus secondary plasma C3 deficiency might help to understand the role of plasma versus intracellular C3 in adaptive immunity. In this thesis we report the immunological features of T, B and dendritic cells from nine individuals with low or no plasma C3 belonging to six families with mutations causing primary or secondary plasma C3 deficiency.

We analyzed their T, dendritic and B cell immunophenotype and function, and whether these parameters correlated with plasma C3 levels. Finally, we studied the intracellular C3 content and localization in T and B cell lines generated from primary or secondary plasma C3-deficient patients.

The results showed that T cell differentiation and function, and B cell function were essentially normal in our cohort. In contrast, naïve to memory B cell differentiation was markedly impaired in both primary and secondary C3 deficiencies, and shown to be plasma C3 level dependent. Also, myeloid DC were reduced and showed low HLA-DR expression. All tested patient's T and B cell lines contained intracellular C3 fragments in exocytosis-associated vesicles, supporting exocytic and CFI-independent cleavage for intracellular C3 metabolism. iC3b/C3dg, but not C3a, localized preferentially to cis-Golgi vesicles, supporting a differential proteolytic intracellular origin. The intracellular C3 fragments tested tended to accumulate in several subcellular compartment in plasma C3-deficient-derived cells, especially in lysosomes, supporting an impaired exocytosis pathway.

Taken together, our results showed that i) plasma C3 generates critical signals for the development of memory B, but not T, lymphocytes, which intracellular C3 cannot replace; and ii) primary plasma C3 deficiency is not associated to an equivalent intracellular C3 fragment deficiency in lymphocytes.



XI. BIBLIOGRAFÍA

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
2. Clarke EV, Tenner AJ. Complement modulation of T cell immune responses during homeostasis and disease. *J Leukoc Biol* 2014; 96:745-56.
3. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaebler WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 2010; 215:1-11.
4. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol* 2004; 25:368-73.
5. Mathern DR, Heeger PS. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10:1636-50.
6. Diebold CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 2014; 343:1260-3.
7. Bajic G, Degn SE, Thiel S, Andersen GR. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J* 2015; 34:2735-57.
8. Kang YH, Tan LA, Carroll MV, Gentle ME, Sim RB. Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways. *Adv Exp Med Biol* 2009; 653:117-28.
9. Bally I, Rossi V, Lunardi T, Thielens NM, Gaboriaud C, Arlaud GJ. Identification of the C1q-binding Sites of Human C1r and C1s: a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement. *J Biol Chem* 2009; 284:19340-8.
10. Kjaer TR, Thiel S, Andersen GR. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Mol Immunol* 2013; 56:413-22.
11. Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013; 61:273-83.
12. Frederiksen PD, Thiel S, Larsen CB, Jensenius JC. M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand J Immunol* 2005; 62:462-73.
13. Krarup A, Thiel S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC. L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. *J Biol Chem* 2004; 279:47513-9.
14. Heja D, Kocsis A, Dobo J, Szilagyi K, Szasz R, Zavodszky P, et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:10498-503.
15. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 1981; 154:856-67.
16. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN. The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol* 2008; 45:2370-9.
17. Lachmann PJ. The amplification loop of the complement pathways. *Adv Immunol* 2009; 104:115-49.
18. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11:785-97.
19. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 1975; 142:856-63.
20. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* 2010; 28:131-55.
21. Leshner AM, Nilsson B, Song WC. Properdin in complement activation and tissue injury. *Mol Immunol* 2013; 56:191-8.

22. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* 2015; 6:262.
23. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 2007; 179:2600-8.
24. Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med* 2008; 12:1074-84.
25. Müller-Eberhard HJ. The killer molecule of complement. *J Invest Dermatol* 1985; 85:47s-52s.
26. Kohl J. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol* 2006; 586:71-94.
27. Kohl J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 2006; 34:157-76.
28. Liszewski KM, Atkinson JP. Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *J Intern Med* 2015; 277:294-305.
29. Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol* 2009; 30:83-90.
30. Ollert MW, David K, Bredehorst R, Vogel CW. Classical complement pathway activation on nucleated cells. Role of factor H in the control of deposited C3b. *J Immunol* 1995; 155:4955-62.
31. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:729-40.
32. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1140-4.
33. Davis AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 2008; 45:4057-63.
34. Zeerleder S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37:362-74.
35. Skidgel RA, Erdos EG. Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator. *Int Immunopharmacol* 2007; 7:1888-99.
36. Zipfel PF, Skerka C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 1999; 20:135-40.
37. Clark SJ, Bishop PN. Role of Factor H and Related Proteins in Regulating Complement Activation in the Macula, and Relevance to Age-Related Macular Degeneration. *J Clin Med* 2015; 4:18-31.
38. Hourcade DE. Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets* 2008; 9:158-64.
39. Preissner KT, Seiffert D. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb Res* 1998; 89:1-21.
40. Schwarz M, Spath L, Lux CA, Paprotka K, Torzewski M, Dersch K, et al. Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity. *Thromb Haemost* 2008; 100:110-8.
41. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 2009; 114:2439-47.
42. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:431-55.
43. Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12:383-401.
44. Jozsi M, Zipfel PF. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol* 2008; 29:380-7.
45. de Cordoba SR, de Jorge EG. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol* 2008; 151:1-13.
46. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlback B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol* 2004; 40:1333-46.

47. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 2006; 118:127-36.
48. Khera R, Das N. Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol* 2009; 46:761-72.
49. Seya T, Atkinson JP. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J* 1989; 264:581-8.
50. Liszewski MK, Kemper C, Price JD, Atkinson JP. Emerging roles and new functions of CD46. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 27:345-58.
51. Yamamoto H, Fara AF, Dasgupta P, Kemper C. CD46: the 'multitasker' of complement proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45:2808-20.
52. Spendlove I, Ramage JM, Bradley R, Harris C, Durrant LG. Complement decay accelerating factor (DAF)/CD55 in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:987-95.
53. Piccoli AK, Alegretti AP, Schneider L, Lora PS, Xavier RM. Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol* 2011; 51:503-10.
54. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Mol Immunol* 2007; 44:73-81.
55. Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol* 1997; 107:1-7.
56. Jiménez-Reinoso A, Marin AV, Regueiro JR. Complement in basic processes of the cell. *Mol Immunol* 2017; 84:10-6.
57. Sacks SH, Zhou W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:431-42.
58. Pantazis P, Kalyanaraman VS, Bing DH. Synthesis of the third component of complement (C3) by lectin-activated and HTLV-infected human T-cells. *Mol Immunol* 1990; 27:283-9.
59. Török K, Kremlitzka M, Sandor N, Toth EA, Bajtay Z, Erdei A. Human T cell derived, cell-bound complement iC3b is integrally involved in T cell activation. *Immunol Lett* 2012; 143:131-6.
60. Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 2013; 39:1143-57.
61. Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* 2010; 120:3421-31.
62. Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:811-20.
63. Kolev M, Kemper C. Keeping It All Going-Complement Meets Metabolism. *Front Immunol* 2017; 8:1.
64. Martin M, Leffler J, Smolag KI, Mytych J, Bjork A, Chaves LD, et al. Factor H uptake regulates intracellular C3 activation during apoptosis and decreases the inflammatory potential of nucleosomes. *Cell Death Differ* 2016; 23:903-11.
65. Elvington M, Liszewski MK, Bertram P, Kulkarni HS, Atkinson JP. A C3(H2O) recycling pathway is a component of the intracellular complement system. *J Clin Invest* 2017; 127:970-81.
66. Liszewski MK, Elvington M, Kulkarni HS, Atkinson JP. Complement's hidden arsenal: New insights and novel functions inside the cell. *Mol Immunol* 2017; 84:2-9.
67. Arbore G, Kemper C. A novel 'Complement - Metabolism - Inflammasome Axis' as a key regulator of immune cell effector function. *Eur J Immunol* 2016.
68. Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AA, Klos A, Rheinheimer C, et al. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science* 2016; 352:aad1210.
69. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013; 43:2797-809.

70. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:251-62.
71. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2016; 8.
72. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009; 30:646-55.
73. Chang JT, Wherry EJ, Goldrath AW. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* 2014; 15:1104-15.
74. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 2012; 482:395-9.
75. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010; 28:445-89.
76. Sanders ME, Makgoba MW, Shaw S. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol Today* 1988; 9:195-9.
77. Terry LA, Brown MH, Beverley PC. The monoclonal antibody, UCHL1, recognizes a 180,000 MW component of the human leucocyte-common antigen, CD45. *Immunology* 1988; 64:331-6.
78. Merckenschlager M, Terry L, Edwards R, Beverley PC. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur J Immunol* 1988; 18:1653-61.
79. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988; 140:2171-8.
80. Yamada A, Kaneyuki T, Hara A, Rothstein DM, Yokoyama MM. CD45 isoform expression on human neonatal T cells: expression and turnover of CD45 isoforms on neonatal versus adult T cells after activation. *Cell Immunol* 1992; 142:114-24.
81. Cossarizza A, Ortolani C, Paganelli R, Barbieri D, Monti D, Sansoni P, et al. CD45 isoforms expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech Ageing Dev* 1996; 86:173-95.
82. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med* 2001; 7:245-8.
83. Song K, Rabin RL, Hill BJ, De Rosa SC, Perfetto SP, Zhang HH, et al. Characterization of subsets of CD4⁺ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:7916-21.
84. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A, et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002; 195:789-94.
85. Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, et al. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 2004; 78:1160-8.
86. Kilpatrick RD, Rickabaugh T, Hultin LE, Hultin P, Hausner MA, Detels R, et al. Homeostasis of the naive CD4⁺ T cell compartment during aging. *J Immunol* 2008; 180:1499-507.
87. Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, Keisker A, Salgo B, Fauchere JC, et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol* 2007; 37:3270-80.
88. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets. *Blood* 2009; 113:769-74.
89. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-12.
90. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;

- 186:1407-18.
91. Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:9-18.
92. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003; 421:388-92.
93. Morgan BP, Marchbank KJ, Longhi MP, Harris CL, Gallimore AM. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol Lett* 2005; 97:171-9.
94. Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, et al. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells. *Immunity* 2008; 28:425-35.
95. Strainic MG, Shevach EM, An F, Lin F, Medof ME. Absence of signaling into CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-beta1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol* 2013; 14:162-71.
96. Le Friec G, Kohl J, Kemper C. A complement a day keeps the Fox(p3) away. *Nat Immunol* 2013; 14:110-2.
97. Cardone J, Le Friec G, Vantourout P, Roberts A, Fuchs A, Jackson I, et al. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat Immunol* 2010; 11:862-71.
98. Cope A, Le Friec G, Cardone J, Kemper C. The Th1 life cycle: molecular control of IFN-gamma to IL-10 switching. *Trends Immunol* 2011; 32:278-86.
99. Le Friec G, Sheppard D, Whiteman P, Karsten CM, Shamoun SA, Laing A, et al. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat Immunol* 2012; 13:1213-21.
100. Kolev M, Dimeloe S, Le Friec G, Navarini A, Arbore G, Povolieri GA, et al. Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reprogramming during Th1 Cell Responses. *Immunity* 2015; 42:1033-47.
101. Heeger PS, Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu J, Muqim N, et al. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med* 2005; 201:1523-30.
102. Liu J, Miwa T, Hilliard B, Chen Y, Lambris JD, Wells AD, et al. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J Exp Med* 2005; 201:567-77.
103. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 2010; 20:34-50.
104. Lipp AM, Juhasz K, Paar C, Ogris C, Eckerstorfer P, Thuenauer R, et al. Lck mediates signal transmission from CD59 to the TCR/CD3 pathway in Jurkat T cells. *PLoS One* 2014; 9:e85934.
105. Wagner C, Ochmann C, Schoels M, Giese T, Stegmaier S, Richter R, et al. The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. *Mol Immunol* 2006; 43:643-51.
106. Kolev M, Le Friec G, Kemper C. The role of complement in CD4(+) T cell homeostasis and effector functions. *Semin Immunol* 2013; 25:12-9.
107. Dunkelberger JR, Song WC. Role and mechanism of action of complement in regulating T cell immunity. *Mol Immunol* 2010; 47:2176-86.
108. Chen A, Gaddipati S, Hong Y, Volkman DJ, Peerschke EI, Ghebrehiwet B. Human T cells express specific binding sites for C1q. Role in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 1994; 153:1430-40.
109. Jiang K, Chen Y, Xu CS, Jarvis JN. T cell activation by soluble C1q-bearing immune complexes: implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:61-7.
110. van Montfoort N, de Jong JM, Schuurhuis DH, van der Voort EI, Camps MG, Huizinga TW, et al. A novel role of complement factor C1q in augmenting the presentation of antigen captured in immune complexes to CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2007; 178:7581-6.
111. Sandor N, Pap D, Prechl J, Erdei A, Bajtay Z. A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes. *Mol Immunol* 2009; 47:438-48.

112. Li K, Fazekasova H, Wang N, Sagoo P, Peng Q, Khamri W, et al. Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells. *Mol Immunol* 2011; 48:1121-7.
113. Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res* 2006; 55:179-84.
114. Peng Q, Li K, Anderson K, Farrar CA, Lu B, Smith RA, et al. Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood* 2008; 111:2452-61.
115. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med* 2002; 8:582-7.
116. Lalli PN, Strainic MG, Yang M, Lin F, Medof ME, Heeger PS. Locally produced C5a binds to T cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. *Blood* 2008; 112:1759-66.
117. Peng Q, Li K, Patel H, Sacks SH, Zhou W. Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. *J Immunol* 2006; 176:3330-41.
118. Peng Q, Li K, Sacks SH, Zhou W. The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8:236-46.
119. Peng Q, Li K, Wang N, Li Q, Asgari E, Lu B, et al. Dendritic cell function in allostimulation is modulated by C5aR signaling. *J Immunol* 2009; 183:6058-68.
120. Ghannam A, Pernollet M, Fauquert JL, Monnier N, Ponard D, Villiers MB, et al. Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181:5158-66.
121. Papp K, Vegh P, Prechl J, Kerekes K, Kovacs J, Csikos G, et al. B lymphocytes and macrophages release cell membrane deposited C3-fragments on exosomes with T cell response-enhancing capacity. *Mol Immunol* 2008; 45:2343-51.
122. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:107-16.
123. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007; 27:190-202.
124. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:487-513.
125. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188:1679-89.
126. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381:751-8.
127. Seifert M, Kuppers R. Human memory B cells. *Leukemia* 2016; 30:2283-92.
128. Fagarasan S, Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000; 290:89-92.
129. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 2016; 45:471-82.
130. Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:412-26.
131. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:149-59.
132. Phan TG, Tangye SG. Memory B cells: total recall. *Curr Opin Immunol* 2017; 45:132-40.
133. Pepys MB. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J Exp Med* 1974; 140:126-45.
134. Pepys MB, Butterworth AE. Inhibition by C3 fragments of C3-dependent rosette formation and antigen-induced lymphocyte transformation. *Clin Exp Immunol* 1974; 18:273-82.
135. van den Elsen JM, Isenman DE. A crystal structure of the complex between human complement receptor 2 and its ligand C3d. *Science* 2011; 332:608-11.
136. Cooper NR, Moore MD, Nemerow GR. Immunobiology of CR2, the B lymphocyte receptor

- for Epstein-Barr virus and the C3d complement fragment. *Annu Rev Immunol* 1988; 6:85-113.
137. Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; 256:105-7.
138. Matsumoto AK, Martin DR, Carter RH, Klickstein LB, Ahearn JM, Fearon DT. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 178:1407-17.
139. Fearon DT, Carroll MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:393-422.
140. Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol* 2001; 167:163-72.
141. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; 271:348-50.
142. Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:545-68.
143. Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 2012; 37:199-207.
144. Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol* 1998; 160:5273-9.
145. Rickert RC. Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:237-43.
146. Klaus GG, Humphrey JH. A re-evaluation of the role of C3 in B-cell activation. *Immunol Today* 1986; 7:163-5.
147. Fischer MB, Ma M, Hsu NC, Carroll MC. Local synthesis of C3 within the splenic lymphoid compartment can reconstitute the impaired immune response in C3-deficient mice. *J Immunol* 1998; 160:2619-25.
148. Phan TG, Green JA, Gray EE, Xu Y, Cyster JG. Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nat Immunol* 2009; 10:786-93.
149. Heesters BA, van der Poel CE, Das A, Carroll MC. Antigen Presentation to B Cells. *Trends Immunol* 2016.
150. Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev* 2007; 219:157-66.
151. Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagen T, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:801-10 e6.
152. Kremlitzka M, Macsik-Valent B, Erdei A. Regulation of B cell functions by Toll-like receptors and complement. *Immunol Lett* 2016.
153. Bekeredian-Ding I, Inamura S, Giese T, Moll H, Endres S, Sing A, et al. Staphylococcus aureus protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. *J Immunol* 2007; 178:2803-12.
154. Fischer WH, Hugli TE. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J Immunol* 1997; 159:4279-86.
155. Rubtsov AV, Rubtsova K, Fischer A, Meehan RT, Gillis JZ, Kappler JW, et al. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* 2011; 118:1305-15.
156. Brodeur SR, Angelini F, Bacharier LB, Blom AM, Mizoguchi E, Fujiwara H, et al. C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity* 2003; 18:837-48.
157. Clark EA, Craxton A. A CD40 bridge between innate and adaptive immunity. *Immunity* 2003; 18:724-5.
158. Cerutti A, Cols M, Puga I. Activation of B cells by non-canonical helper signals. *EMBO Rep* 2012; 13:798-810.
159. Chatterjee P, Agyemang AF, Alimzhanov MB, Degn S, Tsiftoglou SA, Alicot E, et al. Complement

- C4 maintains peripheral B-cell tolerance in a myeloid cell dependent manner. *Eur J Immunol* 2013; 43:2441-50.
160. Heesters BA, Das A, Chatterjee P, Carroll MC. Do follicular dendritic cells regulate lupus-specific B cells? *Mol Immunol* 2014; 62:283-8.
 161. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* 2015; 6:257.
 162. Lyubchenko T, Dal Porto JM, Holers VM, Cambier JC. Cutting edge: Complement (C3d)-linked antigens break B cell anergy. *J Immunol* 2007; 179:2695-9.
 163. Del Nagro CJ, Kolla RV, Rickert RC. A critical role for complement C3d and the B cell coreceptor (CD19/CD21) complex in the initiation of inflammatory arthritis. *J Immunol* 2005; 175:5379-89.
 164. Hundgeburth LC, Wunsch M, Rovituso D, Recks MS, Addicks K, Lehmann PV, et al. The complement system contributes to the pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis by triggering demyelination and modifying the antigen-specific T and B cell response. *Clin Immunol* 2013; 146:155-64.
 165. Granados-Durán P, López-Ávalos MD, Cifuentes M, Pérez-Martín M, Fernández-Arjona MD, Hughes TR, et al. Microbial Neuraminidase Induces a Moderate and Transient Myelin Vacuolation Independent of Complement System Activation. *Front Neurol* 2017; 8:78.
 166. Janzi M, Sjöberg R, Wan J, Fischler B, von Döbeln U, Isaac L, et al. Screening for C3 deficiency in newborns using microarrays. *PLoS One* 2009; 4:e5321.
 167. Whitehead AS, Solomon E, Chambers S, Bodmer WF, Povey S, Fey G. Assignment of the structural gene for the third component of human complement to chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79:5021-5.
 168. Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* 2005; 437:505-11.
 169. Müller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:321-47.
 170. Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today* 1988; 9:387-93.
 171. Davies KA, Schifferli JA, Walport MJ. Complement deficiency and immune complex disease. *Springer Semin Immunopathol* 1994; 15:397-416.
 172. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 1998; 188:2313-20.
 173. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol* 2000; 76:227-324.
 174. Reis ES, Falcão DA, Isaac L. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H. *Scand J Immunol* 2006; 63:155-68.
 175. Singer L, Colten HR, Wetsel RA. Complement C3 deficiency: human, animal, and experimental models. *Pathobiology* 1994; 62:14-28.
 176. Sartz L, Olin AI, Kristoffersson AC, Stahl AL, Johansson ME, Westman K, et al. A novel C3 mutation causing increased formation of the C3 convertase in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol* 2012; 188:2030-7.
 177. Sfyrøera G, Ricklin D, Reis ES, Chen H, Wu EL, Kaznessis YN, et al. Rare loss-of-function mutation in complement component C3 provides insight into molecular and pathophysiological determinants of complement activity. *J Immunol* 2015; 194:3305-16.
 178. Okura Y, Kobayashi I, Yamada M, Sasaki S, Yamada Y, Kamioka I, et al. Clinical characteristics and genotype-phenotype correlations in C3 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137:640-4 e1.
 179. da Silva KR, Fraga TR, Lucatelli JF, Grumach AS, Isaac L. Skipping of exon 27 in C3 gene compromises TED domain and results in complete human C3 deficiency. *Immunobiology*

- 2016; 221:641-9.
180. Botto M, Fong KY, So AK, Koch C, Walport MJ. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. *J Exp Med* 1990; 172:1011-7.
 181. Fremeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, Strain L, Blouin J, Brown AL, et al. Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2008; 112:4948-52.
 182. Martinez-Barricarte R, Heurich M, Valdes-Canedo F, Vazquez-Martul E, Torreira E, Montes T, et al. Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J Clin Invest* 2010; 120:3702-12.
 183. Rodriguez de Cordoba S, Harris CL, Morgan BP, Llorca O. Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:12-22.
 184. Thakkeestian A, McKay GJ, McEvoy M, Chakravarthy U, Chakrabarti S, Silvestri G, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement component 3 and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2011; 173:1365-79.
 185. Brown KM, Kondeatis E, Vaughan RW, Kon SP, Farmer CK, Taylor JD, et al. Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N Engl J Med* 2006; 354:2014-23.
 186. Goldberg M, Fremeaux-Bacchi V, Koch P, Fishelson Z, Katz Y. A novel mutation in the C3 gene and recurrent invasive pneumococcal infection: a clue for vaccine development. *Mol Immunol* 2011; 48:1926-31.
 187. Daha MR, Fearon DT, Austen KF. C3 nephritic factor (C3NeF): stabilization of fluid phase and cell-bound alternative pathway convertase. *J Immunol* 1976; 116:1-7.
 188. Salvadori M, Rosso G. Reclassification of membranoproliferative glomerulonephritis: Identification of a new GN: C3GN. *World J Nephrol* 2016; 5:308-20.
 189. Degen SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet* 2011; 88:689-705.
 190. Shiang R, Murray JC, Morton CC, Buetow KH, Wasmuth JJ, Olney AH, et al. Mapping of the human complement factor I gene to 4q25. *Genomics* 1989; 4:82-6.
 191. Vyse TJ, Bates GP, Walport MJ, Morley BJ. The organization of the human complement factor I gene (IF): a member of the serine protease gene family. *Genomics* 1994; 24:90-8.
 192. Tsiftoglou SA, Arnold JN, Roversi P, Crispin MD, Radcliffe C, Lea SM, et al. Human complement factor I glycosylation: structural and functional characterisation of the N-linked oligosaccharides. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764:1757-66.
 193. Fearon DT. Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure. *J Immunol* 1977; 119:1248-52.
 194. Nilsson SC, Sim RB, Lea SM, Fremeaux-Bacchi V, Blom AM. Complement factor I in health and disease. *Mol Immunol* 2011; 48:1611-20.
 195. Roversi P, Johnson S, Caesar JJ, McLean F, Leath KJ, Tsiftoglou SA, et al. Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:12839-44.
 196. Vyse TJ, Morley BJ, Bartok I, Theodoridis EL, Davies KA, Webster AD, et al. The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J Clin Invest* 1996; 97:925-33.
 197. Genel F, Sjöholm AG, Skattum L, Truedsson L. Complement factor I deficiency associated with recurrent infections, vasculitis and immune complex glomerulonephritis. *Scand J Infect Dis* 2005; 37:615-8.
 198. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood* 2006; 108:1267-79.
 199. Kavanagh D, Richards A, Noris M, Hauhart R, Liszewski MK, Karpman D, et al. Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* 2008; 45:95-105.

200. Ponce-Castro IM, González-Rubio C, Delgado-Cerviño EM, Abarrategui-Garrido C, Fontán G, Sánchez-Corral P, et al. Molecular characterization of Complement Factor I deficiency in two Spanish families. *Mol Immunol* 2008; 45:2764-71.
201. Nilsson SC, Trouw LA, Renault N, Miteva MA, Genel F, Zelazko M, et al. Genetic, molecular and functional analyses of complement factor I deficiency. *Eur J Immunol* 2009; 39:310-23.
202. Nita IM, Genel F, Nilsson SC, Smart J, Truedsson L, Choo S, et al. Molecular characterization of two novel cases of complete complement inhibitor Factor I deficiency. *Mol Immunol* 2011; 48:1068-72.
203. Alba-Dominguez M, Lopez-Lera A, Garrido S, Nozal P, Gonzalez-Granado I, Melero J, et al. Complement factor I deficiency: a not so rare immune defect: characterization of new mutations and the first large gene deletion. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7:42.
204. Haerynck F, Stordeur P, Vandewalle J, Van Coster R, Bordon V, De Baets F, et al. Complete factor I deficiency due to dysfunctional factor I with recurrent aseptic meningo-encephalitis. *J Clin Immunol* 2013; 33:1293-301.
205. Bay JT, Katzenstein TL, Kofoed K, Patel D, Skjoedt MO, Garred P, et al. Novel CFI mutation in a patient with leukocytoclastic vasculitis may redefine the clinical spectrum of Complement Factor I deficiency. *Clin Immunol* 2015; 160:315-8.
206. Franco-Jarava C, Colobran R, Mestre-Torres J, Vargas V, Pujol-Borrell R, Hernandez-Gonzalez M. Clinical laboratory standard capillary protein electrophoresis alerted of a low C3 state and lead to the identification of a Factor I deficiency due to a novel homozygous mutation. *Immunol Lett* 2016; 174:19-22.
207. Sadallah S, Gudat F, Laissue JA, Spath PJ, Schifferli JA. Glomerulonephritis in a patient with complement factor I deficiency. *Am J Kidney Dis* 1999; 33:1153-7.
208. Esparza-Gordillo J, Jorge EG, Garrido CA, Carreras L, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, et al. Insights into hemolytic uremic syndrome: segregation of three independent predisposition factors in a large, multiple affected pedigree. *Mol Immunol* 2006; 43:1769-75.
209. Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5:1844-59.
210. González-Rubio C, Ferreira-Cerdán A, Ponce IM, Arpa J, Fontán G, López-Trascasa M. Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol* 2001; 58:1923-8.
211. Subias Hidalgo M, Yebenes H, Rodriguez-Gallego C, Martin-Ambrosio A, Dominguez M, Tortajada A, et al. Functional and structural characterization of four mouse monoclonal antibodies to complement C3 with potential therapeutic and diagnostic applications. *Eur J Immunol* 2017; 47:504-15.
212. Yssel H, de Waal Malefyt R, Duc Dodon MD, Blanchard D, Gazzolo L, de Vries JE, et al. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection of a CD4+ proliferative/cytotoxic T cell clone progresses in at least two distinct phases based on changes in function and phenotype of the infected cells. *J Immunol* 1989; 142:2279-89.
213. Ballard DW, Bohnlein E, Lowenthal JW, Wano Y, Franza BR, Greene WC. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* 1988; 241:1652-5.
214. Ruben S, Poteat H, Tan TH, Kawakami K, Roeder R, Haseltine W, et al. Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* 1988; 241:89-92.
215. Tosato G, Cohen JL. Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines. *Curr Protoc Immunol* 2007; Chapter 7:Unit 7 22.
216. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11:361-2.
217. Reis ES, Barbutto JA, Kohl J, Isaac L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. *Mol Immunol* 2008; 45:1952-62.

218. Jiménez-Reinoso A, Marin AV, López-Lera A, Subias M, Román-Ortiz E, Arbore G, et al. Human plasma C3 is essential for the development of memory B, but not T, lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2017; Under revision.
219. Wu J, Wu YQ, Ricklin D, Janssen BJ, Lambris JD, Gros P. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol* 2009; 10:728-33.
220. Hasty LA, Lambris JD, Lessey BA, Pruksananonda K, Lyttle CR. Hormonal regulation of complement components and receptors throughout the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:168-75.
221. Palomino WA, Argandona F, Azua R, Kohen P, Devoto L. Complement C3 and decay-accelerating factor expression levels are modulated by human chorionic gonadotropin in endometrial compartments during the implantation window. *Reprod Sci* 2013; 20:1103-10.
222. Klaus GG, Humphrey JH. The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunology* 1977; 33:31-40.
223. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJ, van Tol MJ, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 2006; 354:1901-12.
224. van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandene L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest* 2010; 120:1265-74.
225. van Zelm MC, Bartol SJ, Driessen GJ, Mascart F, Reisli I, Franco JL, et al. Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:135-44.
226. Vince N, Boutboul D, Mouillot G, Just N, Peralta M, Casanova JL, et al. Defects in the CD19 complex predispose to glomerulonephritis, as well as IgG1 subclass deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:538-41 e1-5.
227. Pekkarinen PT, Heikkilä N, Kisand K, Peterson P, Botto M, Daha MR, et al. Dysregulation of adaptive immune responses in complement C3-deficient patients. *Eur J Immunol* 2015; 45:915-21.
228. Einstein LP, Hansen PJ, Ballow M, Davis AE, 3rd, Davis JSt, Alper CA, et al. Biosynthesis of the third component of complement (C3) in vitro by monocytes from both normal and homozygous C3-deficient humans. *J Clin Invest* 1977; 60:963-9.
229. Botto M, Lissandrini D, Sorio C, Walport MJ. Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1992; 149:1348-55.
230. Ghannam A, Fauquert JL, Thomas C, Kemper C, Drouet C. Human complement C3 deficiency: Th1 induction requires T cell-derived complement C3a and CD46 activation. *Mol Immunol* 2014; 58:98-107.
231. Hess C, Kemper C. Complement-Mediated Regulation of Metabolism and Basic Cellular Processes. *Immunity* 2016; 45:240-54.
232. Freeley S, Kemper C, Le Friec G. The “ins and outs” of complement-driven immune responses. *Immunol Rev* 2016; 274:16-32.
233. Katz Y, Singer L, Wetsel RA, Schlesinger M, Fishelson Z. Inherited complement C3 deficiency: a defect in C3 secretion. *Eur J Immunol* 1994; 24:1517-22.

XII. ANEXOS

XII. ANEXOS

1. Consentimiento informado

HOJA DE INFORMACION AL VOLUNTARIO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Fisiopatología de la activación extra e intracelular del linfocito T Código:

Promotor/es e Investigador/es principal/es:

José R. Regueiro, regueiro@med.ucm.es, Telf. 91 394 1631.

Edgar Fernández Malavé, edfernán@med.ucm.es, Telf. 91 394 7220

Dept. de Microbiología I (Inmunología), Fac. Medicina, Univ. Complutense, Madrid, Organismo financiador: MICINN

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el desarrollo del estudio en el que se le propone participar. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Su participación es voluntaria y puede revocar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento. En caso de retirar el consentimiento para participar en el estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de un nuevo análisis.

FUNDAMENTO

El estudio que se va a llevar a cabo trata de profundizar en el estudio del funcionamiento de los linfocitos T a través de pacientes inmunodeficientes. Para llevar a cabo los experimentos necesarios para nuestro proyecto vamos a solicitarle que done muestras de sangre.

BENEFICIOS ESPERADOS E INCONVENIENTES

Es importante destacar el avance que se lograra en el campo de la Inmunología celular, ya que la detección de defectos genéticos permitirá un tratamiento más efectivo y eficaz y mejorara de un modo notable la supervivencia y calidad de vida del individuo. La muestra de sangre que usted done se obtendrá de forma similar a los análisis de sangre convencionales. La toma de muestras de sangre puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y le puede ocasionar un pequeño hematoma que desaparece en pocos días. Más raramente se produce mareo en el momento de la extracción de sangre.

CONFIDENCIALIDAD

Una vez extraída, la muestra será etiquetada con un código único, propio de cada donante. Su muestra se conservara almacenada en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina durante el periodo de ejecución del proyecto. Su uso quedara restringido a los objetivos del proyecto. Como estas investigaciones se prolongan en el tiempo mucho más allá de lo que dura un único proyecto de investigación, las muestras coleccionadas son un material muy valioso, por lo que le solicitamos su autorización expresa para que puedan ser utilizadas en proyectos de investigación venideros, con la condición de que se enmarquen en la misma línea de investigación. En todo caso, dicha utilización se realizara garantizando el cumplimiento de los requerimientos previstos en la Ley de Investigación Biomédica y usted conservara todo el tiempo la facultad de revocar dicho consentimiento. Todos los datos recogidos para el estudio, procedentes de su Historia Clínica, facilitados por usted mismo, o descubiertos durante la investigación, serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal. Debe saber que tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de los mismos en cualquier momento. Solo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación la realizara el Investigador Principal/ Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo el investigador principal/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Durante todo el proyecto, usted conserva el Derecho de revocación del consentimiento y sus efectos, incluida la posibilidad de la destrucción o de la anonimización de la muestra y de que tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo.

En todo momento, usted conserva el derecho a conocer los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.

Se garantiza la confidencialidad de la información obtenida, a la que solamente tendrán acceso los miembros del equipo investigador del proyecto. Debe usted tener en cuenta que existe la posibilidad de que se obtenga información relativa a su salud derivada de los análisis que se realicen sobre su muestra biológica. En todo caso, usted conserva la facultad de decidir si desea o no que dichos datos le sean comunicados. En caso de necesitar cualquier información o por cualquier otro motivo no dude en contactar con el investigador/es principal/es del estudio en el telefono 913941640.

Firma del donante:

Firma del investigador/es:

Nombre:

Nombre/es:

Fecha:

Fecha:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Título del estudio: *Fisiopatología de la activación extra e intracelular del linfocito T*

Código de protocolo:

Promotor/es e Investigador/es Principal/es: Dr. José R. Regueiro y Dr. Edgar Fernández Malavé
Yo (nombre y apellidos, y DNI)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

..... (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y autorizo expresamente a que mis datos y muestras biológicas puedan ser utilizados también en proyectos de investigación venideros sobre la misma línea de investigación.

FECHA:

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FECHA:

FIRMA DEL INVESTIGADOR/ES

2.Obtención del Título de Doctor con Mención Europea (RD1393/2007)

1. Requisitos:

- 1.1. Se podrá incluir en el anverso del título de Doctor/a la mención “Doctor/a europeo/a”, siempre que concurren las siguientes circunstancias:
 - 1.1.1. Que durante el periodo de formación necesario para la obtención del título de doctor, el/la doctorando/a haya realizado una estancia mínima de tres meses fuera de España en una institución de enseñanza superior o centro de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea, cursando estudios o realizando trabajos de investigación que le hayan sido reconocidos por la Universidad Complutense. La estancia podrá realizarse de manera continua o de forma alterna, siempre que el cómputo total de la misma sea de, al menos, 90 días.
 - 1.1.2. Que parte de la tesis doctoral, al menos el resumen y las conclusiones, se haya redactado y sea presentada en una de las lenguas oficiales de la Unión Europea distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España.
 - 1.1.3. Que la tesis haya sido informada por un mínimo de dos expertos/as pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea distinto de España.
 - 1.1.4. Que, al menos, un/a experto/a perteneciente a alguna institución de educación superior o centro de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea distinto de España, con el título de doctor/a, que no será nunca el responsable de la estancia mencionada en el apartado a) ni ninguno de los mencionados en el apartado c), haya formado parte del Tribunal evaluador de la tesis.
- 1.2. La defensa de la tesis ha de ser efectuada en la propia universidad española en la que el/la doctorando/a estuviera inscrito.

2. Tramitación administrativa

El/la doctorando/a interesado/a en obtener la mención de “Doctor europeo” de la Universidad Complutense deberá entregar al Centro/Departamento/Instituto Universitario correspondiente, en el momento de solicitar la admisión a trámite de su Tesis Doctoral, la siguiente documentación:

- a) instancia solicitando que le sea expedida la mención de “Doctor/a europeo/a”
- b) los informes a que se refiere el punto 1.c) de los requisitos.
- c) Certificación del Centro que acredite haber realizado la estancia mínima de tres meses, a que se refiere el punto 1. a) de los requisitos.

La evaluación de los informes y de la certificación indicados en los puntos b) y c) del apartado anterior corresponderá a la Comisión de Doctorado de la Universidad Complutense.

En los casos en que la Comisión de Doctorado dé su visto bueno a la documentación presentada y una vez admitida a trámite la Tesis Doctoral, se remitirá al/la Secretario/a del Tribunal encargado de juzgarla una certificación firmada por el/la Secretario/a de la Comisión, conjuntamente con el resto de la documentación para la lectura de la Tesis.

Tras el acto de defensa de la Tesis, el Secretario del Tribunal certificará que se han cumplido los puntos 1.b) y 1.d) de los requisitos para optar la mención “Doctor europeo”.

3. Acreditación académica de la mención “Doctor europeo”

Se incluirá en el anverso del título de Doctor o Doctora la mención “Doctor europeo”.

El/la Presidente/a de la Comisión de Doctorado, tras haber recibido la documentación elevada por el Tribunal encargado de juzgar la Tesis Doctoral, emitirá un certificado en el que se notificará la concesión de la mención de “Doctor Europeo” y en el que se hará constar el cumplimiento de los requisitos mencionados en el apartado primero.

El doctorado europeo se acreditará haciendo figurar su mención en el certificado de pago de los derechos para la expedición del título.

Tanto en el certificado, como en el anverso del Título se pondrá el sello o anagrama de Doctor/a Europeo/a aprobado por el Comité de Enlace de la Conferencia de Rectores y de Presidentes de las Universidades de países de miembros de la Comunidad Europea, círculo de estrellas de cinco puntas en el que figura inscrita la leyenda “Doctor Europeo”.

3. Currículum vitae

Anaïs Jiménez Reinoso

PERSONAL DATA

Researcher ID K-2453-2014
ORCID 0000-0001-8229-1881
Born October 9, 1987 in Madrid (Spain).
Phone +34 913941640
E-mail a.jimenez.reinoso@gmail.com

CURRENT POSITION

2012-present PhD student, Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine.
Institution Immunology, Dpt. of Microbiology I, School of Medicine, Complutense University.
Address Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid (Spain).
Phone +34 913941640
Fax +34 913941641

EDUCATION

Feb 2012-present PhD student, Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine,
Complutense University of Madrid (Spain).
Sep 2010-Jun 2011 MSc, Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine,
Complutense University of Madrid (Spain).
Sep 2005-Sep 2010 BSc, Biology,
Autonomous University of Madrid (Spain).

RESEARCH EXPERIENCE

2012-present PhD student, Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine,
Complutense University of Madrid (Spain).
Nov 2011-Feb 2012 Research Student,
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid (Spain).
Nov 2010-Sep 2011 Master Thesis Project,
National Microbiology Centre, Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain).
Sep 2009-Jul 2010 Degree Project,
Health Research Institute, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, (Spain).
Jul 2009-Sep 2009 Business Practices,
Health Research Institute, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, (Spain).

TEACHING EXPERIENCE

2012-present University Teaching Assistant, teaching lab techniques in Medicine, Biochemistry and
Pharmacy degrees, Complutense University of Madrid (Spain).

STAYS IN OTHER RESEARCH CENTERS

Apr-Jul 2015 **Centre/Institute:** Guy's Hospital, King's College London (United Kingdom).
Supervisor: Professor Claudia Kemper.
Topic: *Phenotypical and functional characterization of human T cells from plasma C3-deficient patients.*

PARTICIPATION IN RESEARCH PROJECTS

- 2015-2017 Surface and intracellular T lymphocyte activation physiopathology. Ref. SAF2014-54708-R.
PI: Regueiro, JR. / Fernández-Malavé E.
Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO). Complutense Univ. 275000 €.
- 2012-2015 Physiopathology of T cell activation. Ref. 2012/0070.
PI: Regueiro, JR.
Lair Foundation. Complutense University (II120). 24000 €.
- 2012-2015 Physiopathology of T cell activation. Ref. SAF2011-24235.
PI: Regueiro, JR.
Ministry of Science and Innovation (MICINN). Complutense Univ. 193600 € + 1 FPI.
- 2012-2016 Biology and physiopathology of the complement system. Ref. P2010/BMD-2316.
PI: Rodríguez de Córdoba, S.
Community of Madrid (CAM). CIB CSIC, UCM, HULP, HU120. 736000 €.

JOURNAL PUBLICATIONS

- Jiménez-Reinoso A**, Marin AV, López-Lera A, Subias M, Román-Ortiz E, Arbore G, Kolev M, Freeley SJ, Kemper C, Fernández-Malavé E, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M and Regueiro JR. Human plasma C3 is essential for the development of memory B, but not T, lymphocytes. Under revision (2017) in *J Allergy Clin Immunol*. **IF: 12.49**.
- Guasp P, Barnea E, González-Escribano MF, **Jiménez-Reinoso A**, Regueiro JR, Admon A and López de Castro JA. The Behçet's Disease associated variant of the aminopeptidase ERAP1 shapes a low affinity HLA-B*51 peptidome by differential subpeptidome processing (2017). Accepted in *J Biol Chem*. **IF: 4.26**.
- Jiménez-Reinoso A**, Marin AV and Regueiro JR. Complement in basic processes of the cell (2017). *Mol Immunol*. 84:10-16. **IF: 3.38**.
- Marin AV, **Jiménez-Reinoso A**, Briones AC, Muñoz-Ruiz M, Aydogmus C, Pasick L, Couso J, Mazariegos MS, Alvarez-Prado AF, Blázquez-Moreno A, Babayigit Hocaoglu A, Cipe FE, Moreno-Pelayo MA, García-Sánchez F, Gil J, Reyburn HT, Ramiro AR, Recio MJ, Ikinciogullari A, Regueiro JR and Garcillán B. Primary T-cell immunodeficiency caused by a novel mutation in the CD247 subunit of the TCR (2017). *J Allergy Clin Immunol*. 139(1):347-349. **IF: 12.49**.
- Beatriz Garcillán, Ana V. M. Marin, **Anaïs Jiménez-Reinoso**, Alejandro C. Briones, Miguel Muñoz-Ruiz, María J. García-León, Juana Gil, Luis M. Allende, Eduardo Martínez-Naves, María L. Toribio and José R. Regueiro. $\gamma\delta$ T lymphocytes in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies (2015). *Front Immunol*. 6:20. doi: 10.3389/fimmu.2015.00020.
- AVM Marin*, Beatriz (B) Garcillán*, **Anaïs (A) Jiménez-Reinoso***, Miguel (M) Muñoz-Ruiz, Alejandro (AC) Briones, Edgar (E) Fernández-Malavé, Maria Jose (MJ) Recio, Jose Ramon (JR) Regueiro. Human congenital T Cell Receptor disorders (2015). *LymphoSign Journal*. 2:1. doi: 10.14785/lpsn-2014-0012. *Joint first authors.
- Torres JM, Martínez-Barricarte R, García-Gómez S, Mazariegos MS, Itan Y, Boisson B, Rholvarez R, **Jiménez-Reinoso A**, del Pino L, Rodríguez-Pena R, Ferreira A, Hernández-Jiménez E, Toledano V, Cubillos-Zapata C, Díaz-Almirón M, López-Collazo E, Unzueta-Roch JL, Sánchez-Ramón S, Regueiro JR, López-Granados E, Casanova JL, Pérez de Diego R. Inherited BCL10 deficiency impairs hematopoietic and nonhematopoietic immunity (2014). *J Clin Invest*. 124(12):5239-48. **IF: 15.39**.
- García-Zaragoza E, Pérez-Tavarez R, Ballester A, Lafarga V, **Jiménez-Reinoso A**, Ramírez, A., Murillas, R., Gallego MI. Intraepithelial paracrine Hedgehog signaling induces the expansion of ciliated cells that express diverse progenitor cell markers in the basal epithelium of the mouse mammary gland (2012). *Dev Biol*. 372(1):28-44. **IF: 3.64**.
- Fernández-Martín L, Marcos-Ramiro B, Bigarella CL, Graupera M, Cain RJ, Reglero-Real N, **Jiménez A**, Cernuda-Morollón E, Correias I, Cox S, Ridley AJ, Millán J. Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function (2012). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32(8):e90-102. **IF: 6.34**.

CONFERENCE CONTRIBUTIONS

- XXXVII Spanish Congress of Immunology. Salamanca (Spain) 2013. *The Best Poster prize.*
- 4th Annual meeting of the Society for Immunology of the Community of Madrid. Madrid (Spain) 2013.
- XXXVIII Spanish Congress of Immunology. Badajoz (Spain) 2014.
- The 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Prague (Czech Republic) 2014.
- 5th Annual meeting of the Society for Immunology of the Community of Madrid. Madrid (Spain) 2014.
- The 15th European Meeting on Complement in Human Disease. Uppsala (Sweden) 2015. *ECN Travel Award. SEI Travel Grant.*
- 4th European Congress of Immunology. Vienna (Austria) 2015.
- XXXIX Spanish Congress of Immunology. Alicante (Spain) 2016. *Special mention for Oral Presentation. SEI Travel Grant.*
- EMBO Conference: Lymphocyte Antigen Receptor Signaling. Sienna (Italy) 2016. *EMBO Travel Grant.*
- 17th Biennial Meeting of the ESID. Barcelona (Spain) 2016.

SKILLS & OTHER ACTIVITIES

EXPERTISE	<p>Molecular Biology: PCR, sequencing, electrophoresis.</p> <p>Biochemistry: Western blotting, immunoprecipitation.</p> <p>Cell culture: HeLa, EA.hy926, HUVEC, PBL, HTLV-1, HVS, EBV, Daudi, K562, HPB-ALL, Jurkat, Allogeneic Feeder, CHO, B95.8, OP9.</p> <p>Cell biology: Flow cytometry, <i>in vitro</i> proliferation assays, transfection by electroporation, fluorescence and confocal microscopy, T and B cell immortalization, gene silencing by shRNA knock-down.</p> <p>Software: Office, GraphPad Prism, FlowJo, CellQuest Pro, ImageJ, Endnote, Adobe Illustrator/Photoshop/InDesign, SPSS, BioEdit, ChromasPro, UCSF Chimera.</p> <p>Databases: NCBI, Ensembl, HGNC.</p>
COURSES	<p>Scientific Seminars (2 ECTS), Immunology (Microbiology I), School of Medicine, Complutense University (weekly).</p> <p><i>Differential diagnosis and therapeutic guidelines in diseases mediated by the complement system</i> (8h), Hospital Universitario La Paz, Madrid (March 16th, 2012).</p> <p>III Radiological Protection Seminar (2 h), Complutense University of Madrid (2013).</p> <p><i>Diagnosis, therapy and research in diseases mediated by the complement system</i> (8h), Hospital Universitario La Paz, Madrid (November 7th, 2014).</p>
LANGUAGES	<p>Spanish</p> <p>English (First Certificate in English, 2005)</p>
SCIENTIFIC SOCIETIES	<p>Spanish Society for Immunology (SEI)</p> <p>European Federation of Immunological Societies (EFIS)</p> <p>European Society for Immunodeficiencies (ESID)</p> <p>Hospital 12 de Octubre Health Research Institute (i+12)</p>
MANAGEMENT	<p>Member of the Dpt. Council, Immunology (Microbiology I), School of Medicine, Complutense University (Apr 2014-Dec 2016).</p> <p>Dpt. budget supervisor, Immunology, (Microbiology I), School of Medicine, Complutense University (2013-2014).</p> <p>Charge of accounting of the Research project Ref. SAF2011-24235 (2013-present).</p>

GRANTS

Apr-Jul 2015	EFIS-IL short-term fellowship.
2012-2016	Predocctoral fellowship from the Ministry of Economy and Competitivity (FPI).
2010-2011	Scholarship from the Ministry of Education and Science for Master studies.
2009-2010	Scholarship from the Ministry of Education and Science for Degree studies.

4. Publicaciones relevantes a esta tesis

Molecular Immunology 84 (2017) 10–16



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm



Complement in basic processes of the cell



Anaïs Jiménez-Reinoso, Ana V. Marin, José R. Regueiro*

Department of Immunology, Complutense University School of Medicine and Hospital 12 de Octubre Health Research Institute, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2016

Accepted 18 November 2016

Available online 3 December 2016

Keywords:

Complement

T lymphocyte

B lymphocyte

Dendritic cell

Complotype

ABSTRACT

The complement system is reemerging in the last few years not only as key element of innate immunity against pathogens, but also as a main regulator of local adaptive responses, affecting dendritic cells as well as T and B lymphocytes. We review data showing that leucocytes are capable of significant autocrine synthesis of complement proteins, and express a large range of complement receptors, which in turn regulate their differentiation and effector functions while cross talking with other innate receptors such as Toll-like receptors. Other unconventional roles of complement proteins are reviewed, including their impact in non-leukocytes and their intracellular cleavage by vesicular proteases, which generate critical cues required for T cell function. Thus, leucocytes are very much aware of complement-derived information, both extracellular and intracellular, to elaborate their responses, offering rich avenues for therapeutic intervention and new hypothesis for conserved major histocompatibility complex complotypes.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The complement system classically exerts three main activities: host innate defense against infection – through antigen opsonization, driving chemotaxis and leukocyte activation and lysing bacteria and cells –, bridging innate and adaptive immunity – by augmenting antibody responses and enhancing immunologic memory –, and disposing of immune complexes and inflammatory products – through the clearance of tissue immune complexes and apoptotic cells – (Walport, 2001). In the last few years, however, complement has re-emerged as a key regulator of cellular and immunological responses, both innate and adaptive, by pro-

viding costimulation and proliferation signals. Such signals act extracellularly through specific cell receptors of classical fragments (Table 1), some still undefined, but also intracellularly after new cleavage schemes and proteases through specific membrane receptors that probe vesicular structures. Some of those vesicles contain pathogens and thus complement has clear defensive roles, but other vesicles are sterile and likely involved rather in leukocyte regulation. The recent success of complement-targeted therapeutics such as anti-C5 for transplant rejection and hemolytic uremic syndrome or anti-factor I for age-related macular degeneration have fueled heightened interest in the complement system among scientists, clinicians and the pharmaceutical industry. As new unconventional roles may suggest new therapies, we summarize unexpected contributions of hepatic and extrahepatic extracellular and intracellular complement soluble proteins, fragments and receptors to physiopathology of a wide range of cells and tissues.

2. Hepatic versus extrahepatic complement

In mammals most complement proteins are of hepatic origin under normal conditions, with some exceptions such as C1q, C7, properdin and factor D (Morgan and Gasque, 1997), which are predominantly produced by myeloid cells, notably monocytes and macrophages (or adipocytes for factor D, also called adipsin). Under inflammatory conditions, however, both hepatic and extrahepatic production are enhanced (Laufer et al., 2001), and extrahepatic sources may become critical for local protection (or damage), particularly for larger proteins such as C1q (400 kD) or for those that are rapidly cleaved such as C3. For instance, C3 from

Abbreviations: AM, adrenomedullin; AMD, age-related macular degeneration; APC, antigen-presenting cells; BCR, B-cell receptor; bm, bone marrow cells; bmDC, bone marrow dendritic cells; cDC, conventional dendritic cells; CLR, calcitonin receptor-like receptor; CR1, complement receptor 1; CR2, complement receptor 2; CR3, complement receptor 3; CR4, complement receptor 4; DC, dendritic cells; eC3, extracellular C3; FDC, follicular dendritic cells; FH, factor H; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; iC3, intracellular C3; iC5, intracellular C5; IFN- γ , interferon- γ ; IL-12, interleukin 12; IL-2, interleukin 2; IL-4, interleukin 4; KD, knock-down; KO, knock-out; LPS, lipopolysaccharide; MCP, membrane cofactor protein; MHC, major histocompatibility complex; Mo, monocytes; moDC, monocyte-derived dendritic cells; NLRP3, nucleotide-binding domain leucine-rich repeat family pyrin domain containing 3; pDC, plasmacytoid dendritic cells; RAMP2, receptor activity-modifying protein 2; TCR, T-cell receptor; TLR, Toll-like receptors.

* Corresponding author at: Department of Immunology, Complutense University School of Medicine, 28040 Madrid, Spain.

E-mail addresses: ajreinoso@med.ucm.es (A. Jiménez-Reinoso), anavictoriamarin@ucm.es (A.V. Marin), regueiro@med.ucm.es (J.R. Regueiro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.11.011>

0161-5890/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Surface complement receptor expression in B or T cells, monocytes, monocyte-derived dendritic cells and follicular dendritic cells.

		Ligand					Cell type					
		C3a	C3b	iC3b	C3dg	C3c	C5a	B	T	Mo	moDC	FDC
Receptor	Alternative names											
CR1	CD35	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
CR2	CD21	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+
CR3	CD11b/CD18; α _M β ₂ ; Mac-1	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+
CR4	CD11c/CD18; α _X β ₂ ; p150/95	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+
CRlg	Z93lg; VSIG4	—	+	+	—	+	—	—	—	+	+	—
C3aR	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
C5aR1	CD88	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+
C5L2	C5aR2; GPR77	+	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—
MCP	CD46	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
DAF	CD55	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+

Monocytes (Mo), monocyte-derived dendritic cells (moDC) and follicular dendritic cells (FDC). (Arbore et al., 2016; Kremnitzka et al., 2014; Li et al., 2011; Ohno et al., 2000; Qualal et al., 2016; Ricklin et al., 2010; Rubtsov et al., 2011; Török et al., 2015; Zipfel and Skerka, 2009).

bone marrow-derived cells can restore normal lymphoid organ-dependent antibody responses in mice lacking C3 (Fischer et al., 1998). Conversely, the renal contribution to the recipient's plasma C3 pool can increase from the normal 5% to 16% in case of allograft rejection (Tang et al., 1999), and can shorten graft survival time almost ten-fold (Pratt et al., 2002). In other species such as fish the hepatic/extrahepatic complement ratio is reversed (Zhang and Cui, 2014), suggesting that locally synthesized complement may have been the rule rather than the exception earlier in evolution. While most of these studies addressed extracellular complement, they now become relevant in light of the new intracellular roles ascribed to several complement proteins (see below).

3. Extracellular complement

3.1. Complement polymorphisms and tissue damage

The C3 Fast/Slow polymorphism (p.G102R) came to stage because of a report of improved long-term survival of C3F⁺ kidneys transplanted into C3S⁺ recipients (Brown et al., 2006), although it could not be reproduced in a larger study (Varagunam et al., 2009). More recently, C4 polymorphism has been shown to influence renal allograft outcome (Bay et al., 2013). Nevertheless, the C3F allele was reported as detrimental in several disorders where extracellular complement is likely involved in tissue damage, such as several nephropathies, age-related macular degeneration (AMD), or systemic vasculitis, but also in other diseases where the conventional role of complement is more controversial (Table 2). Our contribution to this controversy was the unexpected finding of a strong and apparently primary association of chronic renal failure and C3F in a small sample of Spanish patients (Regueiro and Arnaiz-Villena, 1984). Such associations suggested some sort of functional C3 variation associated with the C3 genotype, which has recently been shown biochemically to be caused by a lower affinity of factor H for C3F as compared to C3S (Harris et al., 2012). Studying the combination of interacting common risk vs protection variants for factor H, factor B and C3 in AMD has defined functional clonotypes that clearly increase disease susceptibility by drastically facilitating complement activation and thus inflammation. The unconventional roles have not been explored under this new light. In this regard, the reported association of C3 gene variants with asthma and Th2-dependent responses suggests a potential unconventional pathogenic mechanism involving T cells (Barnes et al., 2006), perhaps including clonotypes.

The clonotype concept was first coined to define combinations of complement alleles within the major histocompatibility complex, MHC (C2, C4 and factor B), and indeed C2/factor B MHC clonotypes have been reported in connection with AMD protec-

tion (Sun et al., 2012). The conserved linkage of three complement genes within the MHC (class III genes) is still a matter of debate, as classical MHC molecules (class I and class II) are critical for T cell selection and function, seemingly unrelated to the conventional role of complement. It is thus tempting to speculate that the unconventional role of complement in T cells (see 4.1) may explain the conserved mapping of complement genes within ancestral MHC haplotypes (Candore et al., 2002) to ensure balanced protection from pathogens and inflammation.

3.2. Regulation of dendritic cells

The classical role of complement components in dendritic cells (DC) includes inducing migration toward inflamed tissues via the C3a or C5a receptors, or facilitating detection and internalization of opsonized pathogens or immune complexes using complement receptor 3 or 4 (CR3 or CR4, see Table 1). Beyond such roles, several complement components have been shown to impact the differentiation, maturation, cytokine production, Th1/Th2 promotion, and phagocytic capacity of antigen-presenting cells (APC), including DC.

Due to the scarcity of blood DC, the best-studied *in vitro* model for human APC is that of monocyte-derived dendritic cells (moDC) (Fig. 1). The procedure to generate human moDC begins with isolation of monocytes (Mo) from peripheral blood mononuclear cells either by sorting as CD14⁺ cells or by adherence to plastic microtiter plates at 37 °C. Isolated Mo are subsequently cultured for 5 to 7 days with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin 4 (IL-4) to yield immature moDC, which may be fully matured by adding pro-inflammatory mediators such as lipopolysaccharide (LPS) for 24 to 48 h (Castiello et al., 2011). Immature moDC are characterized by low to moderate surface expression of antigen presenting molecules such as MHC-II and CD1a and of T cell activating co-receptors such as CD80 and CD86. Mature moDC express high levels of MHC-II, CD80 and CD86, but not CD1a (Merad et al., 2013). moDC are distinct from conventional or plasmacytoid DC (cDC and pDC, respectively) (Qu et al., 2014), but their easy availability and handling have made them the standard in the field. In mice, by contrast, APC are modelled by a similar strategy but starting with bone marrow cells (bm) cultured in the presence of GM-CSF and isolated as CD11c⁺ cells, which are then termed bmDC. Most of the findings that follow, however, should be confirmed in primary cDC and pDC in both species.

Human Mo and moDC express a wide range of surface complement receptors (Table 1) capable of binding both hepatic and extrahepatic (including autologous) soluble complement proteins. Indeed, both cell types produce autologous complement soluble proteins belonging to all three activation pathways, including C1q,

Table 2
Diseases classified by their likely C3-dependent pathological mechanism.

Disease group	Likely C3-dependent mechanism	
	Conventional	Unconventional/Unknown
Renal	Mesangiocapillary nephritis Glomerulosclerosis Atypical haemolytic uraemic syndrome Dense deposit disease Renal failure Allograft rejection	
Ophthalmological	Age-related macular degeneration	
Rheumatological	Systemic vasculitis Systemic lupus erythematosus	
Dermatological	Atopic dermatitis	
Pulmonary	Tuberculosis	Partial lipodystrophy
Neurological		Asthma
Cardiovascular	Chagas disease cardiomyopathy	Lung cancer Ischaemic stroke
Endocrinological		Hypertension
Gastrointestinal		Myocardial infarction
Haematological		Metabolic syndrome Crohn's disease Non-Hodgkin lymphoma

Adapted from Delanghe et al. (2014).

C3 and C5 (Li et al., 2011; Reis et al., 2006), as shown in mouse bmDC (Peng et al., 2008).

C1q has been shown to enhance DC maturation, achieving higher levels of CD86, MHC-II and interleukin 12 (IL-12), which promote Th1-biased responses (reviewed by Kouser et al., 2015). However, C1q also inhibits the differentiation of Mo into moDC with GM-CSF and IL-4, likely through the inhibitory role of the leukocyte-associated Ig-like receptor, which is known to bind C1q.

Several studies have shown that DC require autologous extracellular C3 (eC3) to reach their full APC potential (Fig. 1). Indeed, murine C3 knock-out (KO) bmDC showed reduced cell surface expression of MHC-II and CD86, reduced LPS-induced synthesis of Th1-polarizing cytokines such as IL-12 and reduced capacity to stimulate alloreactive CD4⁺ T cell proliferation and synthesis of Th1 cytokines such as interferon- γ (IFN- γ) and interleukin 2 (IL-2), and this was confirmed in C3 knock-down (KD) bmDC. Th2 cytokines such as IL-4, by contrast, were increased (Peng et al., 2006). The mechanism likely involves eC3a signaling, as both C3aR KO and C3aR antagonist-treated mouse bmDC showed similar features (Peng et al., 2008). Similarly, Mo from human C3-deficient patients showed impaired differentiation to moDC *in vitro*, with

reduced number of differentiated moDC, reduced expression of CD1a and MHC-II, reduced LPS-induced synthesis of Th1-polarizing cytokines such as IL-12 and reduced capacity to stimulate alloreactive CD4⁺ T cells (Ghannam et al., 2008 and Jiménez-Reinoso, unpublished results).

Similar results have been reported for C5a and its receptors (C5aR in mice and C5aR1 or C5L2 in humans), which are both expressed in normal DC (Fig. 1 and Table 1). Indeed, bmDC from C5aR KO mice showed reduced surface expression of MHC-II and CD86, reduced LPS-induced synthesis of Th1-polarizing cytokines such as IL-12, increased LPS-induced synthesis of Th2-polarizing cytokines such as interleukin 10 (IL-10) and reduced capacity to stimulate alloreactive CD4⁺ T cells (Peng et al., 2009).

These data indicate that C3a and C5a anaphylatoxins share signaling pathways that are required by DC to reach their full APC program, including efficient antigen presentation, T cell costimulation and Th1 polarization. When such signals are impaired, as shown in KO mice, a weaker and Th2-skewed DC phenotype is apparent, and thus termed tolerogenic. Enhancement of those signals by adding soluble C3a or C5a in human Mo to moDC differentiation cultures essentially confirmed mouse data, supporting that

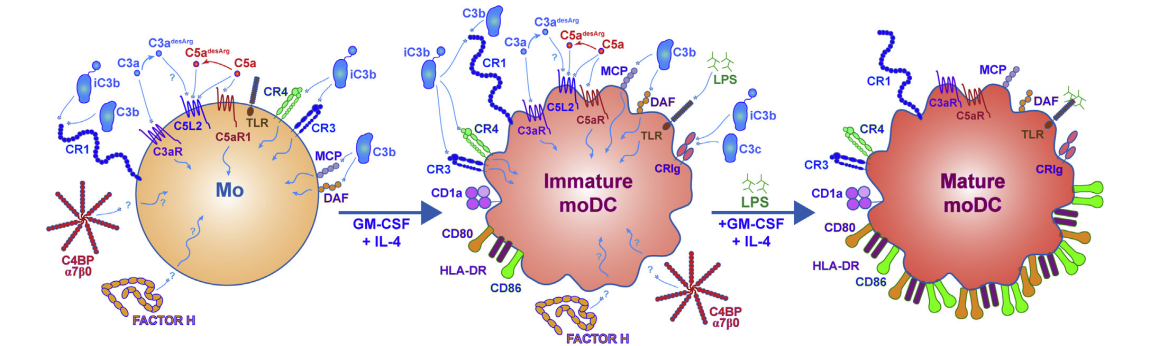


Fig. 1. Differentiation of Mo (left) by incubation with GM-CSF and IL-4 into immature moDC (center) and, by adding LPS, into mature moDC (right). Hepatic as well as extrahepatic soluble complement proteins affect moDC differentiation through known or unknown (?) receptors, as indicated. C4BP, C4b-binding protein; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IL-4, interleukin 4; LPS, lipopolysaccharide; ?, unknown surface receptor.

it is a general mechanism connecting innate and adaptive immunity (Li et al., 2012).

Recently, other soluble complement proteins have been shown to regulate human DC maturation. For instance, addition of factor H (FH) to human Mo to moDC differentiation cultures down-regulated moDC surface costimulatory proteins expression and shifted their cytokines toward a Th2 rather than Th1 pattern (Olivar et al., 2016), resulting in a tolerogenic and anti-inflammatory phenotype, very much like C3a or C5a. The authors further showed that FH-dependent DC modulation was unrelated to its complement regulation role and independent of CR3 or CR4 or surface glycosaminoglycans, but mapped to the 19–20 CCP surface-binding FH region, although the exact mechanism remains elusive. Similar results were reported for the C4-binding protein $\alpha\beta\beta$ 0 isoform (C4BP lacking the β -chain), which induces semimature and tolerogenic moDC (Olivar et al., 2013).

In summary, DC differentiation in mice or human can be regulated by complement components such as C1q, C3, C5, and inhibitors such as FH and C4BP, all of which can be produced in response to inflammatory signals, to become tolerogenic and anti-inflammatory, thus amenable to exploitation for the treatment of inflammatory disorders such as transplant rejection, hypersensitivity or autoimmune disorders.

3.3. Regulation of B lymphocytes

B lymphocytes can also respond to hepatic and extrahepatic complement (Table 1). However, the regulation of B cells by complement is connected to its opsonizing activity, rather than to inflammation as shown in DC. More than 40 years ago it was demonstrated that thymus-dependent antibody production was impaired when C3 was depleted by cobra venom factor (Pepys, 1974). The mechanism was later shown to involve the interaction between C3 fragments C3d(g) and their receptor, complement receptor 2 (CR2, van den Elsen and Isenman, 2011), which belongs to the B cell co-receptor (CR2/CD19/CD81, Matsumoto et al., 1993). CR2 is also expressed in the surface of follicular dendritic cells (FDC) in order to accumulate opsonized antigens in germinal centers. Binding of C3d(g)-opsonized antigen to CR2 on B cells strongly lowers the threshold for B cell activation (Dempsey et al., 1996), thus improving antibody formation and facilitating the differentiation of naive B cells into effector and memory B cells (Fang et al., 1998). Recent findings in CR2-deficient patients indeed showed that hypogammaglobulinemia in such patients is due to sub-optimal B-cell receptor (BCR) costimulation (Thiel et al., 2012).

Toll-like receptors (TLR) also interplay with CR to modulate B cell functions. Several self-damaged or microbial products (nucleic acids, zymosan, LPS) quickly trigger the complement cascade as well as TLR signaling (Kremlitzka et al., 2016). *Staphylococcus aureus* Cowan strain I + IL-2-activated B cells express C3aR, and C3a as well as C3a(desArg) have been shown to have a direct suppressive effect in antibody and cytokine production via TLR2 (Bekeredjian-Ding et al., 2007; Fischer and Hugli, 1997). Further, it has recently been shown that co-engagement of complement receptor 1 (CR1) and TLR9 inhibits BCR-triggered B cell proliferation, and antibody and cytokine production (Kremlitzka et al., 2015).

CR and TLR may also be involved in the unresolved issue of gender-biased autoimmunity, as TLR7-induced age-associated CR3⁺CR4⁺CR2⁻ B cells, believed to be involved in the production of autoantibodies, were higher in aged female mice than in young females or in males of any age. Similar CR4⁺CR2⁻ age-associated B cells were present in peripheral blood of elderly women with rheumatoid arthritis or systemic sclerosis, but not in healthy control women (Rubtsov et al., 2011).

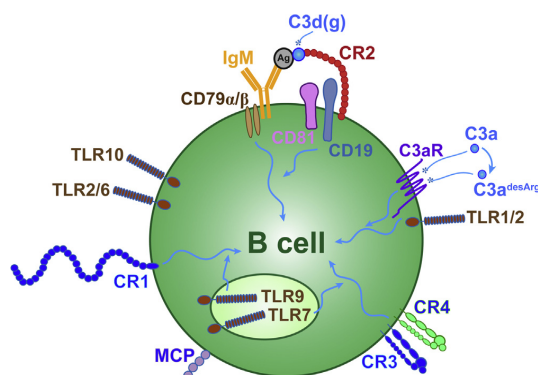


Fig. 2. Complement receptors, C3-derived cleavage fragments and Toll-like receptors (TLRs) expressed on B cells. TLR ligands: TLR1/2: lipoproteins/lipopeptides; TLR2/6: lipopeptides; TLR7: RNA; TLR9: CpG DNA; TLR10: unknown (adapted from Kremlitzka et al., 2016).

In summary, extracellular complement regulates B cell function through CR and TLR crosstalk (Fig. 2).

3.4. Regulation of T lymphocytes

In mice models, extracellular C3a and C5a generated from T and APC endogenous production interact with C3aR and C5aR on both cell types and these engagements participate in maintaining their viability, activation and cytokine production by both partners (Strainic et al., 2008). Impairing these interactions reduced MHC-II and costimulatory molecules expression (CD28 and CD40L) dramatically diminishing T cell responses, and in the opposite direction, costimulatory molecules engagement upregulate complement production. Thus both axis, C3a/C3aR and C5a/C5aR1, exhibit overlapping but not fully redundant function because inhibition or deficiency of both has a significantly more profound effect than the absence or blockade of either alone.

3.5. Unconventional roles of extracellular complement proteins

The chronic activation of the alternative pathway of complement causing low-level inflammation has been associated with metabolic disorders (reviewed in Moreno-Navarrete et al., 2010). Indeed, several complement proteins can be secreted by the adipose tissue, some exclusively such as factor D (adipsin), but also factor B and FH, which are strongly associated with obesity and regulate the alternative pathway C3 convertase. They may thus generate C3a and C3a(desArg) (also called acylation-stimulating protein), which have been shown to bind C5aR2 and stimulate triglyceride synthesis in adipocytes. When absent, as in C3 KO mice, lipid abnormalities ensue. In humans, C3a(desArg) levels are high in metabolic disorders including obesity and type 2 diabetes and in individuals at risk of arterial disease, and low in association with exercise and weight loss, which connects with the unconventional role of FH discussed above.

FH has an unconventional role as adrenomedullin-binding protein 1 (Sim et al., 2015). Adrenomedullin (AM) is a constitutively secreted but short-lived pleiotropic peptide, expressed widely, including leucocytes, but particularly high in the vascular endothelium. Through its main vascular receptor AM1, a dimer of calcitonin receptor-like receptor (CLR) and receptor activity-modifying protein 2 (RAMP2), AM is involved in the regulation of vascular integrity, including the maintenance of vascular structure, the regulation of angiogenesis and the protection of vascular injury, and

is strongly increased in septic shock and cardiovascular diseases in humans. Therefore, AM has many potential clinical applications, but its short half-life makes it impractical for chronic diseases. FH, which is 105-fold more abundant than AM, appears to protect it from degradation while preserving its biological activity, thus they could potentially be used together to treat vascular disorders or to prevent cancer angiogenesis.

In addition to its role as recognition molecule of the complement classical pathway, C1q plays a large number of unconventional roles unrelated to complement, including clearance of apoptotic cells and modulation of disparate cell types such as dendritic cells (see 3.2) and microglia (reviewed by Kouser et al., 2015). Numerous reports also suggest that C1q plays an important role in normal pregnancy through its local role in fetal trophoblast invasion of the decidua, as its deficiency can lead to implantation failure. C1q is also produced locally in the central nervous system, and is believed to exert neuroprotective functions upon interaction with aggregated proteins that cause neurodegenerative diseases, such as β -amyloid in Alzheimer's disease, and to participate in synaptic pruning during neuronal development. Indeed, microglia, astrocytes, and neurons are known to secrete complement proteins, especially under stress, injury, ischemia, or infection. Lastly, C1q has been shown to promote angiogenesis during wound healing through local deposition in endothelial cells, which respond by increasing permeability, proliferation and tube formation.

Considerable evidence has been published supporting communication between the complement and coagulation systems (Kenawy et al., 2015). Indeed, disseminated coagulation due to trauma or blood loss cause strong complement activation, which in turn accelerates coagulation.

4. Intracellular complement

Although a more specific review will address this topic in this series, we will include a brief outline of the emerging unconventional role of intracellular complement components, which may help to understand some of the unresolved issues.

4.1. Regulation of T lymphocytes

Conventional extracellular C3 and C5 cleavage during microbial infection leads to induction of an inflammatory response, including the mobilization of phagocytes toward their powerful chemoattractant fragments C3a and C5a (Ricklin et al., 2010).

Several years ago PHA-activated T cells and HTLV-1-transformed T cell lines were shown to synthesize and release C3 (Pantazis et al., 1990), which at that time was believed to increase extracellular C3 for its conventional cleavage. More recently it was demonstrated that TCR-activated T cells synthesize iC3b that appears on the cell surface (Török et al., 2012). Unexpectedly, the intracellular C3-cleaving enzyme was shown to be cathepsin L (CTSL) rather than the conventional plasma convertases (Liszewski et al., 2013). In addition, cleaving of intracellular C3 (iC3) was shown by the same authors to be essential for T cell homeostasis through intracellular binding of C3a to C3aR (Fig. 3). They further showed that intracellular C3a and C3b shuttle to the cell surface following TCR activation, where they stimulate C3aR and membrane cofactor protein (MCP), respectively, for full Th1 induction.

Thus, autocrine iC3 has a crucial role in the induction and modulation of T cell function (Kolev et al., 2014).

Very recently it has been shown that this unconventional mechanism is also functional in apoptotic cells, which actively internalize FH to enhance CTSL-mediated iC3 cleavage and thus increased surface iC3b opsonization (Martin et al., 2016).

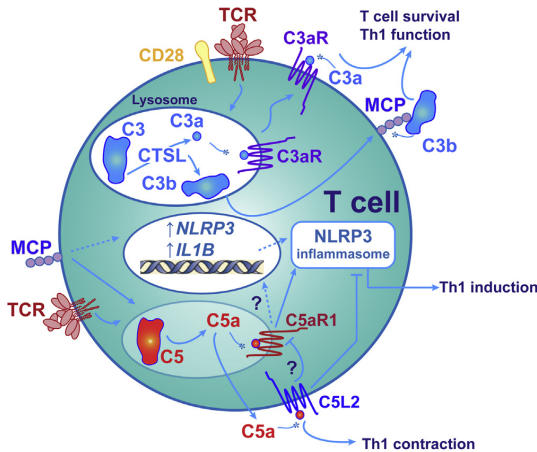


Fig. 3. iC3 and iC5 activation mechanisms. iC3 activation by cathepsin L (CTSL) is crucial for T cell survival and for T cell differentiation after T-cell receptor (TCR)-activation. Secreted intracellular C3a and C3b promote Th1 functions through their surface receptors. TCR and MCP signaling generates iC5a that binds to intracellular C5aR1, leading to nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) assembly and Th1 induction, whereas secreted intracellular C5a binds to surface C5L2 negatively regulating this mechanism. Adapted from (Arbore et al., 2016; Liszewski et al., 2013).

Table 3
Complement proteins and receptors expressed by T lymphocytes as tested with different techniques.

Protein	Technique			
	FC	CM	WB	RT-PCR
C3	+	+	+	+
C3a	+	+	+	+
C3aR	+	+	ND	+
C5a	+	+	ND	+
C5aR1	+	+	+	+
C5aR2	+	+	+	+

Data from Liszewski et al. (2013) and Arbore et al. (2016). FC: flow cytometry. CM: confocal microscopy. WB: Western blot. RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction. +: positive result. ND: not determined.

On the other side of the T/APC synapse iC3 had also been reported to regulate the generation of T cell ligands through its putative role as a chaperone of endocytosed C3-opsonized antigens in the endolysosomal compartment of the MHC class II pathway (Serra et al., 1997), which adds to the reported role of extracellular C3 in DC (see 3.2).

Therefore, iC3 may have wider unconventional roles in multiple cell types, particularly in adaptive immunity, than previously recognized.

The similar extracellular roles of C3 and C5 and the finding of unexpected cellular roles for iC3 stimulated the search of intracellular functions also for C5 (Table 3), which have been very recently reported (Arbore et al., 2016). Indeed, intracellular C5 (iC5) is cleaved within CD4⁺ T cells and its activation is required for the assembly of the T-cell's NLRP3 inflammasome, promoting interleukin-1 β secretion and, thereby, IFN- γ production and autocrine Th1 induction (Fig. 3). Although the protease responsible for iC5 cleavage remains unknown, this finding highlights the important role of intracellular activation of complement components for T cell function, and opens a new door for therapy through the modulation of Th1 responses in autoimmunity and infections.

Conflict of interest

All authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO SAF2014-54708-R). AJR was supported by MINECO (FPI BES-2012-055054); AVM by Comunidad de Madrid (CAM S2010/BMD-2316) and Complutense/Harvard University (CT46/15).

References

- Arbore, G., West, E.E., Spolski, R., Robertson, A.A., Klos, A., Rheinheimer, C., Dutow, P., Woodruff, T.M., Yu, Z.X., O'Neill, L.A., et al., 2016. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science* 352, aad1210, <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad1210>.
- Barnes, K.C., Grant, A.V., Baltadzhieva, D., Zhang, S., Berg, T., Shao, L., Zambelli-Weiner, A., Anderson, W., Nelsen, A., Pillai, S., et al., 2006. Variants in the gene encoding C3 are associated with asthma and related phenotypes among African Caribbean families. *Genes Immun.* 7, 27–35, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6364267>.
- Bay, J.T., Schejbel, L., Madsen, H.O., Sorensen, S.S., Hansen, J.M., Garred, P., 2013. Low C4 gene copy numbers are associated with superior graft survival in patients transplanted with a deceased donor kidney. *Kidney Int.* 84, 562–569, <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2013.195>.
- Bekeredjian-Ding, I., Inamura, S., Giese, T., Moll, H., Endres, S., Sing, A., Zahringer, U., Hartmann, G., 2007. *Staphylococcus aureus* protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. *J. Immunol.* 178, 2803–2812.
- Brown, K.M., Kondeatis, E., Vaughan, R.W., Kon, S.P., Farmer, C.K., Taylor, J.D., He, X., Johnston, A., Horsfield, C., Janssen, B.J., et al., 2006. Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N. Engl. J. Med.* 354, 2014–2023, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa052825>.
- Candore, G., Lio, D., Colonna Romano, G., Caruso, C., 2002. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmun. Rev.* 1, 29–35.
- Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, F.M., Krensky, A.M., Stroncek, D.F., 2011. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 457–466, <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-010-0954-6>.
- Delanghe, J.R., Speckaert, R., Speckaert, M.M., 2014. Complement C3 and its polymorphism: biological and clinical consequences. *Pathology (Phila.)* 46, 1–10, <http://dx.doi.org/10.1097/PAT.0000000000000042>.
- Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C., Fearon, D.T., 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348–350.
- Fang, Y., Xu, C., Fu, Y.X., Holers, V.M., Molina, H., 1998. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J. Immunol.* 160, 5273–5279.
- Fischer, W.H., Hugli, T.E., 1997. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF- α , IL-6, and the polyclonal immune response. *J. Immunol.* 159, 4279–4286.
- Fischer, M.B., Ma, M., Hsu, N.C., Carroll, M.C., 1998. Local synthesis of C3 within the splenic lymphoid compartment can reconstitute the impaired immune response in C3-deficient mice. *J. Immunol.* 160, 2619–2625.
- Ghannam, A., Pernollet, M., Fauquet, J.L., Monnier, N., Ponard, D., Villiers, M.B., Peguet-Navarro, J., Tridon, A., Lunardi, J., Gerlier, D., et al., 2008. Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J. Immunol.* 181, 5158–5166.
- Harris, C.L., Heurich, M., Rodriguez de Cordoba, S., Morgan, B.P., 2012. The complement: dictating risk for inflammation and infection. *Trends Immunol.* 33, 513–521, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.06.001>.
- Kenawy, H.I., Boral, I., Bevington, A., 2015. Complement-coagulation cross-talk: a potential mediator of the physiological activation of complement by low pH. *Front. Immunol.* 6, 215, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00215>.
- Kolev, M., Le Fric, G., Kemper, C., 2014. Complement-tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 811–820, <http://dx.doi.org/10.1038/nri3761>.
- Kouser, L., Madhukaran, S.P., Shastri, A., Saraon, A., Ferluga, J., Al-Mozaini, M., Kishore, U., 2015. Emerging and novel functions of complement protein C1q. *Front. Immunol.* 6, 317, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00317>.
- Kremilitzka, M., Csáti, Z., Erdei, A., 2014. Expression and function of C3 and C3aR in human B cells – a novel cross-talk between complement, TLRs and adaptive immunity. *Mol. Immunol.* 61.
- Kremilitzka, M., Macsik-Valent, B.A.P.E.K.G.P., Erdei, A., 2015. Complement receptor type 1 (CD35) regulates TLR-mediated human B cell functions – a novel cross-talk between complement, TLRs and adaptive immunity occurring also in SLE patients. *Mol. Immunol.* 67, 153–154.
- Kremilitzka, M., Macsik-Valent, B., Erdei, A., 2016. Regulation of B cell functions by toll-like receptors and complement. *Immunol. Lett.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.07.015>.
- Laufer, J., Katz, Y., Passwell, J.H., 2001. Extrahepatic synthesis of complement proteins in inflammation. *Mol. Immunol.* 38, 221–229.
- Li, K., Fazekasova, H., Wang, N., Sagoo, P., Peng, Q., Khamri, W., Gomes, C., Sacks, S.H., Lombardi, G., Zhou, W., 2011. Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells. *Mol. Immunol.* 48, 1121–1127, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2011.02.003>.
- Li, K., Fazekasova, H., Wang, N., Peng, Q., Sacks, S.H., Lombardi, G., Zhou, W., 2012. Functional modulation of human monocytes derived DCs by anaphylatoxins C3a and C5a. *Immunobiology* 217, 65–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.033>.
- Liszewski, M.K., Kolev, M., Le Fric, G., Leung, M., Bertram, P.G., Fara, A.F., Subias, M., Pickering, M.C., Drouet, C., Meri, S., et al., 2013. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 39, 1143–1157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.018>, S1074-7613(13)00509-8 [ii].
- Martin, M., Leffler, J., Smolag, K.I., Mytych, J., Bjork, A., Chaves, L.D., Alexander, J.J., Quigg, R.J., Blom, A.M., 2016. Factor H uptake regulates intracellular C3 activation during apoptosis and decreases the inflammatory potential of nucleosomes. *Cell Death Differ.* 23, 903–911, <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2015.164>.
- Matsumoto, A.K., Martin, D.R., Carter, R.H., Klickstein, L.B., Ahearn, J.M., Fearon, D.T., 1993. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178, 1407–1417.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>.
- Moreno-Navarrete, J.M., Martinez-Barricarte, R., Catalan, V., Sabater, M., Gomez-Ambrosi, J., Ortega, F.J., Ricart, W., Blüher, M., Frühbeck, G., Rodriguez de Cordoba, S., et al., 2010. Complement factor H is expressed in adipose tissue in association with insulin resistance. *Diabetes* 59, 200–209, <http://dx.doi.org/10.2337/db09-0700>.
- Morgan, B.P., Gasque, P., 1997. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin. Exp. Immunol.* 107, 1–7.
- Ohno, M., Hirata, T., Enomoto, M., Araki, T., Ishimaru, H., Takahashi, T.A., 2000. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol. Immunol.* 37, 407–412.
- Olivar, R., Luque, A., Naranjo-Gomez, M., Quer, J., Garcia de Frutos, P., Borrás, F.E., Rodriguez de Cordoba, S., Blom, A.M., Aran, J.M., 2013. The alpha7beta0 isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells. *J. Immunol.* 190, 2857–2872, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200503>, jimmunol.1200503 [ii].
- Olivar, R., Luque, A., Cardenas-Brito, S., Naranjo-Gomez, M., Blom, A.M., Borrás, F.E., Rodriguez de Cordoba, S., Zipfel, P.F., Aran, J.M., 2016. The complement inhibitor factor H generates an anti-inflammatory and tolerogenic state in monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 196, 4274–4290, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1500455>.
- Pantazis, P., Kalyanaraman, V.S., Bing, D.H., 1990. Synthesis of the third component of complement (C3) by lectin-activated and HTLV-infected human T-cells. *Mol. Immunol.* 27, 283–289.
- Peng, Q., Li, K., Patel, H., Sacks, S.H., Zhou, W., 2006. Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. *J. Immunol.* 176, 3330–3341.
- Peng, Q., Li, K., Anderson, K., Farrar, C.A., Lu, B., Smith, R.A., Sacks, S.H., Zhou, W., 2008. Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood* 111, 2452–2461, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-095018>.
- Peng, Q., Li, K., Wang, N., Li, Q., Asgari, E., Lu, B., Woodruff, T.M., Sacks, S.H., Zhou, W., 2009. Dendritic cell function in allostimulation is modulated by C5aR signaling. *J. Immunol.* 183, 6058–6068, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0804186>.
- Pepys, M.B., 1974. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J. Exp. Med.* 140, 126–145.
- Pratt, J.R., Basheer, S.A., Sacks, S.H., 2002. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat. Med.* 8, 582–587, <http://dx.doi.org/10.1038/nm0602-582>.
- Qu, C., Brinck-Jensen, N.S., Zang, M., Chen, K., 2014. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.* 19, 1–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2013.09.023>.
- Qualai, J., Li, L.X., Cantero, J., Tarrats, A., Fernandez, M.A., Sumoy, L., Rodolosse, A., McSorley, S.J., Genesca, M., 2016. Expression of CD11c is associated with unconventional activated T cell subsets with high migratory potential. *PLoS One* 11, e0154253, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154253>.
- Regueiro, J.R., Arnaiz-Villena, A., 1984. C3 polymorphism, HLA and chronic renal failure in Spaniards. *Hum. Genet.* 67, 437–440.
- Reis, E.S., Barbutto, J.A., Isaac, L., 2006. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm. Res.* 55, 179–184, <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-006-0068-y>.

- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D., 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785–797, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1923>.
- Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R.T., Gillis, J.Z., Kappler, J.W., Marrack, P., 2011. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* 118, 1305–1315, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-01-331462>.
- Serra, V.A., Cretin, F., Pepin, E., Gabert, F.M., Marche, P.N., 1997. Complement C3b fragment covalently linked to tetanus toxin increases lysosomal sodium dodecyl sulfate-stable HLA-DR dimer production. *Eur. J. Immunol.* 27, 2673–2679, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830271029>.
- Sim, R.B., Ferluga, J., Al-Rashidi, H., Abbow, H., Schwaeble, W., Kishore, U., 2015. Complement factor H in its alternative identity as adrenomedullin-binding protein 1. *Mol. Immunol.* 68, 45–48, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.006>.
- Strainic, M.G., Liu, J., Huang, D., An, F., Lalli, P.N., Muqim, N., Shapiro, V.S., Dubyak, G.R., Heeger, P.S., Medof, M.E., 2008. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* 28, 425–435, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.001>.
- Sun, C., Zhao, M., Li, X., 2012. CFB/C2 gene polymorphisms and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Curr. Eye Res.* 37, 259–271, <http://dx.doi.org/10.3109/02713683.2011.635401>.
- Török, K., Kremlitzka, M., Sandor, N., Toth, E.A., Bajtay, Z., Erdei, A., 2012. Human T cell derived, cell-bound complement iC3b is integrally involved in T cell activation. *Immunol. Lett.* 143, 131–136.
- Török, K., Dezső, B., Bencsik, A., Uzonyi, B., Erdei, A., 2015. Complement receptor type 1 (CR1/CD35) expressed on activated human CD4+ T cells contributes to generation of regulatory T cells. *Immunol. Lett.* 164, 117–124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.02.009>.
- Tang, S., Zhou, W., Sheerin, N.S., Vaughan, R.W., Sacks, S.H., 1999. Contribution of renal secreted complement C3 to the circulating pool in humans. *J. Immunol.* 162, 4336–4341.
- Thiel, J., Kimmig, L., Salzer, U., Grudzien, M., Lebrecht, D., Hagen, T., Draeger, R., Voelken, N., Bergbreiter, A., Jennings, S., et al., 2012. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 801–810.e6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.027> (e806).
- van den Elsen, J.M., Isenman, D.E., 2011. A crystal structure of the complex between human complement receptor 2 and its ligand C3d. *Science* 332, 608–611, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1201954>.
- Varagunam, M., Yaqoob, M.M., Dohler, B., Opelz, G., 2009. C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 360, 874–880, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0801861>.
- Walport, M.J., 2001. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 1058–1066, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>.
- Zhang, S., Cui, P., 2014. Complement system in zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 46, 3–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.01.010>.
- Zipfel, P.F., Skerka, C., 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 729–740, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2620>.

Human plasma C3 is essential for the development of memory B, but not T, lymphocytes

Anaïs Jiménez-Reinoso, MSc^a; Ana V. Marin, MSc^a; Alberto López-Lera, PhD^{b,c}; Marta Subías, MSc^{c,d}; Elena Román-Ortiz, MD^e; Giuseppina Arbore, PhD^f; Martin Koley, PhD^f; Simon J. Freeley, PhD^f; Claudia Kemper, PhD^f; Edgar Fernández-Malavé, PhD^a; Santiago Rodríguez de Córdoba, PhD^{c,d}; Margarita López-Trascasa, PhD^{b,c}; and José R. Regueiro, PhD^a.

From ^athe Department of Immunology, Complutense University School of Medicine and Hospital 12 de Octubre Health Research Institute, Madrid, Spain; ^bthe Immunology Unit, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; the ^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; the ^dCentro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain; the ^eServicio de Nefrología Pediátrica, Hospital La Fe, Valencia, Spain; and the ^fMRC Centre for Transplantation, Division of Transplant Immunology and Mucosal Biology, King's College London, London, SE1 9RT, United Kingdom.

Supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO SAF2011-24235 and SAF2014-54708-R to JRR, SAF2011-26583 and SAF2015-66287-R to SRdC, SAF2012-38636 to MLT), by Comunidad de Madrid (CAM S2010/BMD-2316 to JRR, SRdC and MLT), by Fundación Lair (2012/0070 to JRR), by Ciber de Enfermedades Raras (CIBERER to SRdC and MLT) and by the Seventh Framework Programme European Union Project EURENOMICS (305608) (to SRdC). AJR was supported by MINECO (FPI BES-2012-055054) and EFIS-IL (EFIS-IL Short-Term Fellowship), AVM by Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2316) and Universidad Complutense (CT46/15) and ALL by MINECO and CIBERER. Work in the Kemper laboratory was supported by the MRC Centre grant MR/J006742/1, an EU-funded Innovative Medicines Initiative BTCURE (C.K.), a Wellcome Trust Investigator Award (C.K.), the National Institute for Health Research (NIHR) Biomedical Research Centre based at Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust and King's College London, and the King's Bioscience Institute at King's College London (G.A.).

Disclosure of potential conflict of interest: the authors declare no competing financial interests.

CORRESPONDING AUTHOR:

José R. Regueiro
Department of Immunology
Complutense University School of Medicine
28040 Madrid, Spain.
Telephone no.: +34913941631 Fax no.: +34916941641
E-mail: regueiro@med.ucm.es

CAPSULE SUMMARY:

C3 deficiency due to mutations in *C3* or in *complement Factor I* revealed that plasma C3 directly influences memory B, but not T, cell differentiation, independently of intracellular C3.

KEYWORDS: C3 deficiency, memory, B cells, T cells, factor I

51 **To the Editor:**

52

53 Primary C3 deficiency is an extremely rare autosomal-recessive inherited disease,
54 with less than 40 families described worldwide. Plasma C3 and intracellular C3 are
55 BCR and TCR costimulators, respectively, but their relative contribution has remained
56 difficult to dissect, particularly in humans. The absence of plasma C3 can be caused by
57 primary C3 deficiency, due to mutations in *C3*, but also by secondary C3 deficiency,
58 due to mutations in C3 regulators such as complement factor I (FI)¹. We reasoned that
59 studying B and T cell differentiation and function comparatively in primary *versus*
60 secondary plasma C3 deficiency might help to understand the role of plasma *versus*
61 intracellular C3 in adaptive immunity. Here we report the immunological features of
62 lymphocytes from nine individuals with low or no plasma C3 belonging to six families
63 with mutations causing primary or secondary C3 deficiency (see Figure E1 and Table
64 E1 in the Online Repository).

65

66 To study whether reduced plasma C3 levels could affect lymphocyte
67 differentiation, primary and secondary plasma C3-deficient patients, healthy carriers
68 (HC) and healthy donors (HD) were immunophenotyped and compared for several T
69 and B cell subsets, including those representing successive differentiation stages.
70 Absolute lymphocyte numbers were always within normal values (not shown). T
71 lymphocyte differentiation was essentially normal (see Fig E2, *A* in the Online
72 Repository), and no significant differences were detected when individuals above or
73 below the 40 mg/dL plasma C3 threshold were compared (see Fig E2, *B*). In contrast,
74 impaired naïve to memory B cell differentiation was observed in both primary and
75 secondary plasma C3-deficient patients (Fig 1, *A*), with increased naïve
76 (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) B cells, and reduced unswitched (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) and switched
77 (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) memory B cells. Such changes were significant when plasma C3
78 levels were below the 40 mg/dL threshold (Fig 1, *B*).

79

80 B cell regulation by complement involves antigen opsonization by C3d and
81 recognition through CD21/CR2, a component of the B cell co-receptor², which strongly
82 lowers the threshold for B cell activation³. To further determine a possible role of
83 circulating C3 (i.e., C3-opsonizing fragments) in the generation of memory B cells, we
84 analyzed the correlation between plasma C3 levels and B or T cell subpopulations in
85 our cohort. The results showed a positive correlation of plasma C3 levels with the
86 frequency of unswitched memory B cells, and a negative correlation with that of naïve
87 B cells, both statistically significant, but not with total B cell frequency (Fig 1, *C*).
88 Plasma C3 levels also positively correlated with switched memory B cell levels,
89 although without reaching statistical significance. In contrast, none of the T cell
90 subpopulations analyzed correlated with plasma C3 levels (see Fig E2, *C*). Impaired
91 memory B cell differentiation has been reported in primary C3 deficiency⁴. Here we
92 demonstrate that reduced plasma C3 levels, whether primary or secondary, results in a
93 selective defect in the *in vivo* differentiation of memory B, but not T, lymphocytes.

94

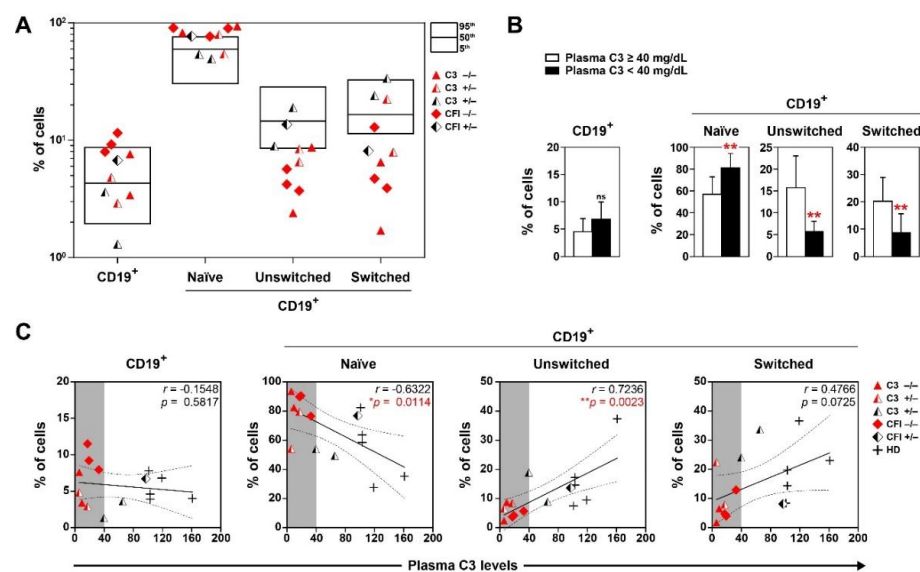


FIG 1. B lymphocyte immunophenotype. **A**, B cell subset frequencies compared with normal percentiles (n=10 HC + patients vs 12 HD). Symbols as in Table E1. **B**, B cell subsets (mean±SD) of individuals below (patients) or above (HD + HC) the 40 mg/dL plasma C3 threshold. ns: non-significant; **p <0.01. **C**, Correlation analysis (Pearson's r) of B cell subsets and plasma C3. Solid lines are best-fit linear regressions, dashed lines are 95% confidence intervals. Gray areas mark the < 40 mg/dL C3 range.

To explore whether the defect in memory B cell development caused by C3 deficiency was associated to altered T or B cell function, PBMC were studied. *Ex vivo* T and B cell function, measured as proliferation in response to mitogens (see Fig E3 in the Online Repository), or *in vivo* B cell function, measured as immunoglobulin or vaccine-specific antibody levels (see Table E2 in the Online Repository), were mostly normal in our cohort, despite their undetectable or ablated plasma C3 levels. Although C3 deficiency has been associated with recurrent bacterial infections¹ and decreased proliferation against specific recall antigens, neither primary nor secondary plasma C3-deficient patients in our cohort showed clinical features suggestive of severe T or B cell defects, and the response to mitogens was normal, as reported previously⁴.

Intracellular C3 fragments have been identified in both B and T lymphocytes⁵. Indeed, upon TCR engagement, cathepsin-L-cleaved intracellular C3 seems to be required for T cell homeostasis and for induction of Th1 responses⁵. Hence, we generated pure T and B cell lines from our cohort and analyzed their intracellular C3 content by flow cytometry using specific mAb against two C3-associated neo-epitopes (anti-C3a and anti-iC3b/C3dg, see Fig E4 in the Online Repository), or anti-CD46 and anti-CD19 as positive controls. The results showed that all tested T and B cells derived from primary or secondary plasma C3-deficient patients expressed intracellular C3 fragments at levels that were indistinguishable from those of HD (see Fig E5, A in the Online Repository), even when individuals above (HD + HC) or below (patients) the 40 mg/dL plasma C3 threshold were compared (Fig 2, A). In addition, intracellular C3a augmented similarly in cells from plasma C3-deficient patients or HD after TCR activation (see Fig E5, B). Of note, intracellular C3a and iC3b/C3dg fragments showed different subcellular locations, with iC3b/C3dg, but not C3a, found predominantly associated to the Cis-Golgi (Fig 2, B and C). These results suggest a differential intracellular location of the cleaving enzymes generating these complement fragments⁶.

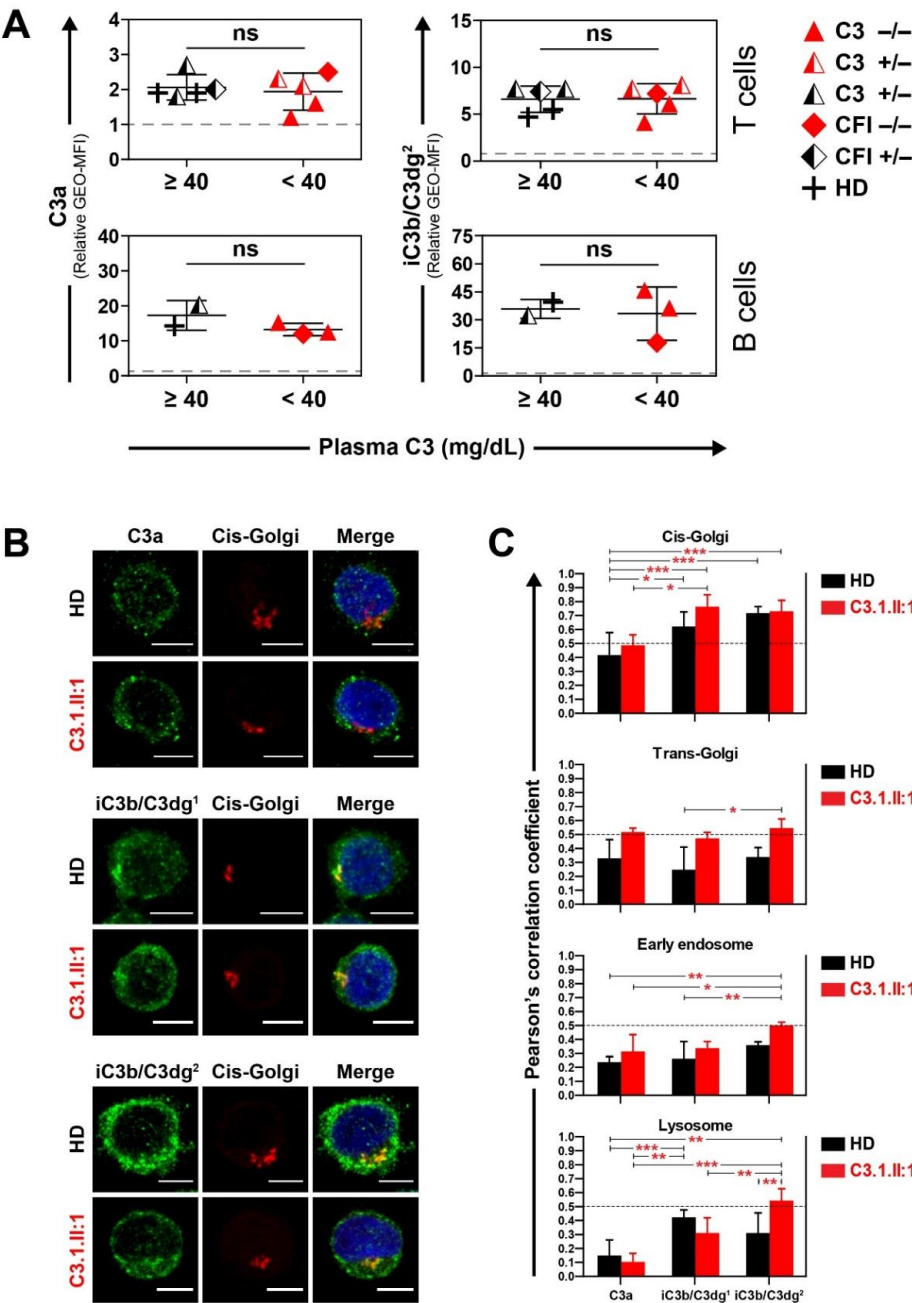


FIG 2. Intracellular C3 analysis in T cell lines from plasma C3-deficient patients. **A**, Intracellular C3 fragments in single cell lines from donors above or below the 40 mg/dL plasma C3 threshold (flow cytometry). Data are mean±SD of GEO-MFI relative to isotype controls (dashed lines). ns: non-significant. **B**, Subcellular T cell colocalization of C3 fragments with Cis-Golgi (confocal microscopy x60 using two iC3b/C3dg-specific mAb, scale bars 5 µm). **C**, Statistical analysis of C3 fragment colocalization with several subcellular compartments (mean±SD; only r > 0.5 were considered, dashed horizontal lines; p<*0.05, **0.01, ***0.001).

Taken together, these results indicate that primary plasma C3 deficiency is not associated to an equivalent intracellular C3 deficiency in lymphocytes, and suggest that intracellular C3 activation is not involved in memory B cell differentiation. However, it is conceivable that the intracellular C3 content in T cells from plasma C3-deficient patients lead to some (proliferation) but not all (Th1 induction) normal T cell functional parameters. Furthermore, although the mechanism remains unknown, the present data strongly support our previous suggestion that complete (combined intra- and extracellular) C3/C5 deficiency may not exist in humans⁷.

In summary, our study shows that plasma, but not intracellular, C3 signals are required for normal memory B, but not T, cell differentiation in a plasma C3 level-dependent fashion, as primary and secondary C3 deficiency shared an impaired memory B cell development that was independent from the intracellular C3 content of B-lymphocytes.

We thank all patients, families, HD and clinicians for their cooperation, the members of Secugen S.L. and the DNA sequencing laboratory at CIB for invaluable technical assistance with patient sequencing and genotyping. We also thank Mercedes Domínguez for the anti-iC3b/C3dg neo-epitope antibodies, and Marina S. Mazariegos, Pedro Roda, Rocio Ramirez-Munoz and Patricia Castro-Sánchez for technical support.

Anaïs Jiménez-Reinoso, MSc^a

Ana V. Marin, MSc^a

Alberto López-Lera, PhD^{b,c}

Marta Subias, MSc^{c,d}

Elena Román-Ortiz, MD^e

Giuseppina Arbore, PhD^f

Martin Kolev, PhD^f

Simon J. Freeley, PhD^f

Claudia Kemper, PhD^f

Edgar Fernández-Malavé, PhD^a

Santiago Rodríguez de Córdoba, PhD^{c,d}

Margarita López-Trascasa, PhD^{b,c}

José R. Regueiro, PhD^a

From ^athe Department of Immunology, Complutense University School of Medicine and Hospital 12 de Octubre Health Research Institute, Madrid, Spain; ^bthe Immunology Unit, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; the ^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; the ^dCentro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain; the ^eServicio de Nefrología Pediátrica, Hospital La Fe, Valencia, Spain; and the ^fMRC Centre for Transplantation, Division of Transplant Immunology and Mucosal Biology, King's, College London, London, SE1 9RT, United Kingdom. E-mail: regueiro@med.ucm.es

Supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO SAF2011-24235 and SAF2014-54708-R to JRR, SAF2011-26583 and SAF2015-66287-R to SRdC, SAF2012-38636 to MLT), by Comunidad de Madrid (CAM S2010/BMD-2316 to JRR, SRdC and MLT), by Fundación Lair (2012/0070 to JRR), by Ciber de Enfermedades Raras (CIBERER to SRdC and MLT) and by the Seventh Framework Programme European Union Project EUREnOmics (305608) (to SRdC). AJR was

supported by MINECO (FPI BES-2012-055054) and EFIS-IL (EFIS-IL Short-Term Fellowship), AVM by Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2316) and Universidad Complutense (CT46/15) and ALL by MINECO and CIBERER. Work in the Kemper laboratory was supported by the MRC Centre grant MR/J006742/1, an EU-funded Innovative Medicines Initiative BTCURE (C.K.), a Wellcome Trust Investigator Award (C.K.), the National Institute for Health Research (NIHR) Biomedical Research Centre based at Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust and King's College London, and the King's Bioscience Institute at King's College London (G.A.).

REFERENCES

1. Reis ES, Falcão DA, Isaac L. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H. *Scand J Immunol* 2006; 63:155-68. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01729.x.
2. Matsumoto AK, Martin DR, Carter RH, Klickstein LB, Ahearn JM, Fearon DT. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 178:1407-17. doi:10.1084/jem.178.4.1407.
3. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; 271:348-50. doi:10.1126/science.271.5247.348.
4. Ghannam A, Pernollet M, Fauquert JL, Monnier N, Ponard D, Villiers MB, et al. Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181:5158-66. doi:10.4049/jimmunol.181.7.5158.
5. Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 2013; 39:1143-57. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.018.
6. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:581-93. doi:10.1038/nri2567.
7. Hess C, Kemper C. Complement-Mediated Regulation of Metabolism and Basic Cellular Processes. *Immunity* 2016; 45:240-54. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.003.

ONLINE REPOSITORY MATERIAL

METHODS

Donors, complement profile, genetic diagnosis and lymphocyte isolation

Ten different individuals belonging to six different families with primary (due to *C3* mutations) or secondary (due to *Factor I* or *CFI* mutations) plasma *C3* deficiency were studied (Fig E1). In all cases, age- and sex-matched healthy donors (HD) were included ($n \leq 18$). Plasma *C3* levels and genetic data as well as symbols used in all other figures are summarized in Table E1. Healthy carriers (HC) and patients were classified according to their primary or secondary *C3* deficiency, their genetic status (homozygous $-/-$, or heterozygous $+/-$), but also by a 40 mg/dL threshold for very low plasma *C3* levels observed in all patients with clinical features (red symbols). All HC and HD had plasma $C3 \geq 40$ mg/dL.

Plasma *C3* levels were measured by nephelometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from peripheral blood (EDTA) by density-gradient centrifugation (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare). *C3* and *CFI* mutations screening and genotyping were performed as previously described^{E1, E2}.

All samples were obtained after written informed consent from the donors or their guardians, and all studies were performed according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Research Ethics Committees of the hospitals involved.

Case reports

C3.1.II:1 is a 17-year-old membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) type I homozygous primary plasma *C3*-deficient patient of Pakistani origin, born to consanguineous parents. From age 12 to 15 he suffered from IgA-negative cutaneous episodes of vasculitis and knee arthralgia resembling Schönlein-Henoch Purpura (HSP). He also suffered one severe episode of pneumonia with pleural effusion that required draining. Despite signs of microhematuria and microalbuminuria, renal function was preserved. Renal biopsies showed *C3*-negative linear glomerular deposits with intense immunofluorescence staining (4/4) for IgM, *C4* and *C1q* and intermediate (3/4) for IgA, IgG, kappa and lambda chains, as well as focal mesangial deposits weakly staining for IgA, IgG, *C4* and *C1q*. **C3.1.I:1** is his HC father with low plasma *C3* levels.

C3.2.II:1 is a 12 year-old Spanish MPGN immunofluorescence-negative homozygous primary plasma *C3*-deficient patient who presented macroscopic hematuria and proteinuria in the nephritic range but no signs of renal dysfunction or infectious disease. As observed in **C3.1.II:1**, he presented recurrent HSP-like IgA-negative vasculitis in the lower limbs. He received a complete immunization with two doses of Prevenar[®] before 2 years of age and showed high IgG levels against pneumococcus due to a dose of Pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV-23, Pneumovax[®]23) at 8 years of age. He also displayed no immune hemolytic anemia associated to splenomegaly. Enzymatic disorder and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria was ruled out. Immunofluorescence staining of renal biopsies was repeatedly negative. **C3.2.I:2** is his HC mother with low plasma *C3* levels.

C3.3.II:2 is a 38 year-old Spanish MPGN type I heterozygous primary plasma *C3*-deficient patient. At age 15 he suffered a sepsis episode with generalized HSP and renal insufficiency, presently persistent reduced *C3* levels in serum, proteinuria and

mild hematuria. A renal cortex biopsy showed a high proportion of sclerotized glomeruli. Non-sclerotized glomeruli showed a lobulated morphology and mesangial proliferation, endocapillar hypercellularity and capillary wall thickening. Direct immunofluorescence revealed intense granular C3 staining in the mesangium and peripheral regions and weakly intense staining of IgM, C1q, kappa chains and IgA in peripheral subendothelial regions.

C3.4.I:1 is a 48 year-old healthy heterozygous primary plasma C3-deficient Spanish man with mild proteinuria and microhematuria.

CFL.1.II:1 is 39 year-old woman with secondary plasma C3 deficiency due to a homozygous mutation in *CFI* reported previously^{E2, E3}. She debuted at 16 years of age with a meningococcal septicemia coincident with menstruation. From age 22, she developed up to 20 monthly recurrent episodes of acute meningitis around the perimenstrual period. Her younger sister aged 29 (**CFL.1.II:4**) has the same genotype and secondary plasma C3 deficiency.

CFL.2.II:2 is a 53 year-old woman with secondary plasma C3 deficiency due to a homozygous mutation in *CFI*^{E2}. She suffered several episodes of otitis during childhood and was diagnosed of juvenile chronic polyarthritis and HSP at 11. She suffered meningococcal meningitis at 17 and meningococcal pneumonia at 19 years of age. Two of her siblings have a clinical history of infectious diseases (otitis, septic arthritis and lymphocytic meningitis). She is presently asymptomatic.

Extracellular flow cytometry

The following mAbs were used: CD3 (A07746), CD4 (A07751, A07752), CD8 (A07756, A07758), CD19 (A07771), and CD45RA (IM0584U) from Beckman Coulter; CD27 (555440), CD31 (555446), IgD (555779), and TCR $\gamma\delta$ (333141) from BD Biosciences; TCR $\alpha\beta$ (306717) from BioLegend. FACSCalibur instrument (BD Biosciences); and CellQuestPro (BD Biosciences) and FlowJo (Tree Star) software were used for the analysis.

Gating strategy for B immunophenotype: CD19⁺ lymphocytes were analyzed for IgD⁺CD27⁻ (naïve), IgD⁺CD27⁺ (unswitched) and IgD⁻CD27⁺ (switched) cell distributions. Gating strategy for T immunophenotype: lymphocytes were analyzed for CD3⁺, $\alpha\beta$ ⁺ or $\gamma\delta$ ⁺ cell distribution, CD3⁺ lymphocytes were analyzed for CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD45RA⁺ CD31⁺ (recent thymic emigrants or RTE), CD4⁺ CD45RA⁺CD31⁻ (central naïve or CN) and CD4⁺CD45RA⁻ (memory) cell distributions.

Proliferation in response to mitogens and antibody titers

PBMC were stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, from Molecular Probes) and cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS for 5 days after stimulation with 1 μ g/mL plate-coated anti-CD3 (UCHT-1, OKT3; eBioscience), 5 μ g/mL *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA), 10 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA) and 1 μ M ionomycin, 8 μ g/mL *Phytolacca americana* pokeweed (PWM) (Sigma-Aldrich) or 10 ng/mL superantigens (*Staphylococcal* Enterotoxin B or E, SEB, SEE; Toxin Technology, Inc.). CFSE dilution was analyzed by flow cytometry as reported^{E4}. Vaccine-specific serum antibody titers were determined with ImmunoCAP[®] Rc208 kit (for anti-Tetanus toxoid IgG levels) (Phadia, Uppsala, Sweden); Human anti-Diphtheria Toxoid IgG EIA kit (Binding Site, Birmingham, UK), Rubella ELISA IgG kit (Viracell, Granada, Spain), Varicella ELISA IgG kit from Viracell, Enzygnost[®]

anti-Measles virus IgG kit (Siemens, Marburg, Germany). Anti-pneumococcal IgG titers were measured with an in-house ELISA using Pneumo23[®] polysaccharide pneumococcal vaccine as antigen and HRP-labelled goat anti-human IgG as detection antibody.

Generation of transformed T and B cell lines

Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-transformed T cell lines, which have been reported to synthesize higher intracellular C3 than resting or activated primary T cells^{E5}, were generated as reported^{E6}, and maintained in RMPI-1640 supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco), and 100 IU/mL recombinant human IL-2 (provided by Craig W. Reynolds, Frederick Cancer Research and Development Center, NCI, NIH, Frederick, Maryland, USA). B cells were transformed as described^{E7} and maintained in RMPI-1640 supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine, 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco).

Intracellular flow cytometry

Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% saponin, or using commercial kits (Cytfix/Cytoperm, 554722 from BD Biosciences; Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent, 00-5521-00 from eBioscience). Primary and secondary antibody dilutions and washings were performed in saponin-containing buffer. Intracellular C3 detection was performed by flow cytometry using several mouse anti-human C3-specific monoclonal antibodies (mAbs) (Fig E4): SIM320.12.2.1 (iC3b/C3dg¹) and SIM320.12.3.1 (iC3b/C3dg²) were produced in house and detect a CFI-cleavage dependent neo-epitope of the C-terminal domain of both iC3b and C3dg fragments (IgG1 isotype); clone 2991 (ab11873 from Abcam, IgG1 isotype) detects a C3 convertase-dependent C3a neo-epitope. CD46 (555948 from BD Biosciences) or CD19 (A07771, PE-Cy5 from Beckman Coulter) were used as positive controls for T or B cell lines, respectively. For purified mAb several PE-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibodies were used: goat F(ab')₂ anti-mouse IgG (H+L) (731856 from Beckman Coulter or 12-4010-87 from eBioscience) and goat anti-mouse IgG (550589, BD Biosciences).

Confocal microscopy

For subcellular localizations analysis of C3a and iC3b/C3dg fragments, cells were fixed and permeabilized using Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (00-5521-00 from eBioscience), and blocked with 1X Permeabilization Buffer (00-8333-56 from eBioscience) with 1% hIgG + 10% FBS (Gibco). Primary and secondary antibody dilutions and staining washes were also performed in 1X Permeabilization Buffer. C3a and iC3b/C3dg fragments were detected using the same mAb as for intracellular flow cytometry (Fig 2, B). Subcellular compartments were detected using rabbit anti-human polyclonal antibodies (from Thermo-Fisher Scientific): GM130 (Cis-Golgi, PA1-077), Trans-Golgi Network 46 (Trans-Golgi, PA1-1069), EEA1 (Early endosome, PA1-063A) and Lamp1 (Lysosome, PA1-654A). Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat anti-Mouse IgG (H+L) Superclonal[™] and Alexa Fluor[®] 555-conjugated goat anti-Rabbit IgG (H+L) Superclonal[™] were used as secondary antibodies (A28175 and A27039, from Invitrogen). Mouse IgG1 (eBioscience) and rabbit IgG (Abcam) were used as isotype controls. Cells were mounted using ProLong[®] Gold with DAPI (P36935 from Molecular Probes) and images (represented as maximum intensity projections from Z-stacks) were obtained in the Center for Cytometry and Fluorescence Microscopy of Complutense University with an

377 Olympus FV1200 Confocal Microscope and analyzed with Fiji/ImageJ (NIH, USA).
378 Pearson's correlation coefficients *Rcoloc* from Fiji/ImageJ were used for statistical
379 analysis, and colocalization was accepted when $r > 0.5$ (dashed lines in Fig 2, C).

380 For intracellular C3a expression analysis after TCR activation, cells were
381 analyzed before or after activation in 48-well plates coated with 2.0 µg/mL mAb against
382 CD3 (OKT3 clone, purified from a hybridoma in Kemper's Lab), for 36 hours. Cells
383 were fixed and permeabilized using Cytotfix/Cytoperm (554722 from BD Biosciences),
384 and blocked with 1X Perm/Wash (554723 from BD Biosciences) with 10% FBS
385 (Gibco). Primary and secondary antibody dilutions and staining washes were also
386 performed in 1X Perm/Wash buffer. C3a and iC3b/C3dg fragments were detected using
387 the same mAb as for intracellular flow cytometry, above and Fig E5); Alexa Fluor®
388 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG (H+L) from Invitrogen (A11059) was used as
389 secondary antibody. Cells were mounted with VECTASHIELD HardSet Antifade
390 Mounting Medium with DAPI (H-1500, from Vector Laboratories, Inc.) and images
391 (represented as maximum intensity projections from Z-stacks) were obtained in the
392 King's College London Nikon Imaging Centre by confocal microscopy with an A1R Si
393 Confocal Microscope (x100 objective) and analyzed with NIS Elements software
394 (Nikon™, Surrey, UK).

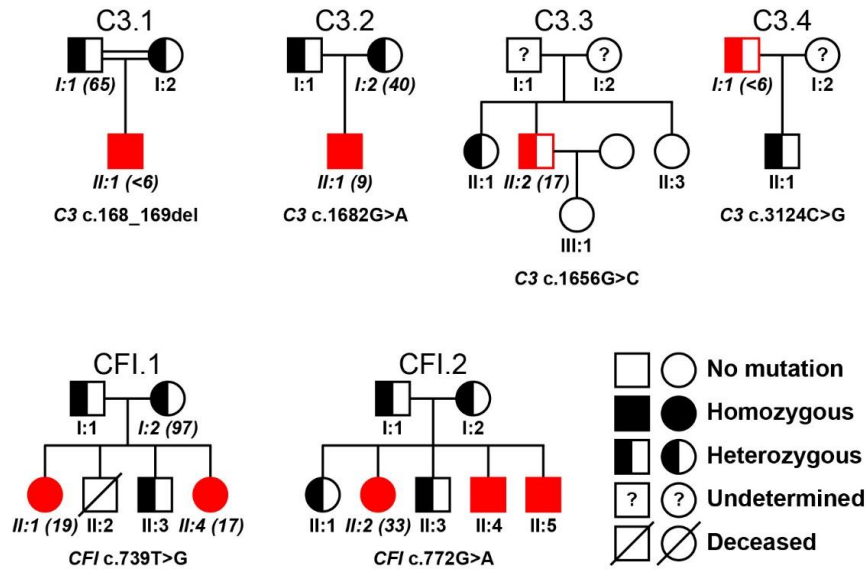
395 396 **Statistical analysis**

397 Results are shown either as scatter dot plots compared with the normal 5th, 50th
398 and 95th percentiles in boxes, or as mean + or ± standard deviation (SD). Two-tailed
399 Student's t test, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-hoc test, and
400 Pearson's correlation coefficient method with two-tailed p-value, were performed in the
401 latter using GraphPad Prism (La Jolla, CA), and significance was considered only when
402 p-values were < 0.05 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).
403

ONLINE REPOSITORY REFERENCES

- E1. Martínez-Barricarte R, Heurich M, Valdes-Canedo F, Vazquez-Martul E, Torreira E, Montes T, et al. Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J Clin Invest* 2010; 120:3702-12. doi:10.1172/JCI43343.
- E2. Ponce-Castro IM, González-Rubio C, Delgado-Cerviño EM, Abarrategui-Garrido C, Fontán G, Sánchez-Corral P, et al. Molecular characterization of Complement Factor I deficiency in two Spanish families. *Mol Immunol* 2008; 45:2764-71. doi:10.1016/j.molimm.2008.02.008.
- E3. González-Rubio C, Ferreira-Cerdán A, Ponce IM, Arpa J, Fontán G, López-Trascasa M. Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol* 2001; 58:1923-8. doi:10.1001/archneur.58.11.1923.
- E4. Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A* 2011; 79:95-101. doi:10.1002/cyto.a.21010.
- E5. Pantazis P, Kalyanaraman VS, Bing DH. Synthesis of the third component of complement (C3) by lectin-activated and HTLV-infected human T-cells. *Mol Immunol* 1990; 27:283-9. doi:10.1016/0161-5890(90)90141-L.
- E6. Yssel H, de Waal Malefyt R, Duc Dodon MD, Blanchard D, Gazzolo L, de Vries JE, et al. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection of a CD4+ proliferative/cytotoxic T cell clone progresses in at least two distinct phases based on changes in function and phenotype of the infected cells. *J Immunol* 1989; 142:2279-89.
- E7. Tosato G, Cohen JI. Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines. *Curr Protoc Immunol* 2007; Chapter 7:Unit 7 22. doi:10.1002/0471142735.im0722s76.

432 ONLINE REPOSITORY FIGURES
433



434
435
436 **FIG E1.** Pedigrees studied. Mutations in *C3* or *CFI* (*Factor I*) are shown below each
437 family tree. Plasma C3 values (mg/dL) of all the individuals studied (patients+HC) are
438 shown between brackets; all symbols in red indicate members with plasma C3 < 40
439 mg/dL threshold with clinical features.
440

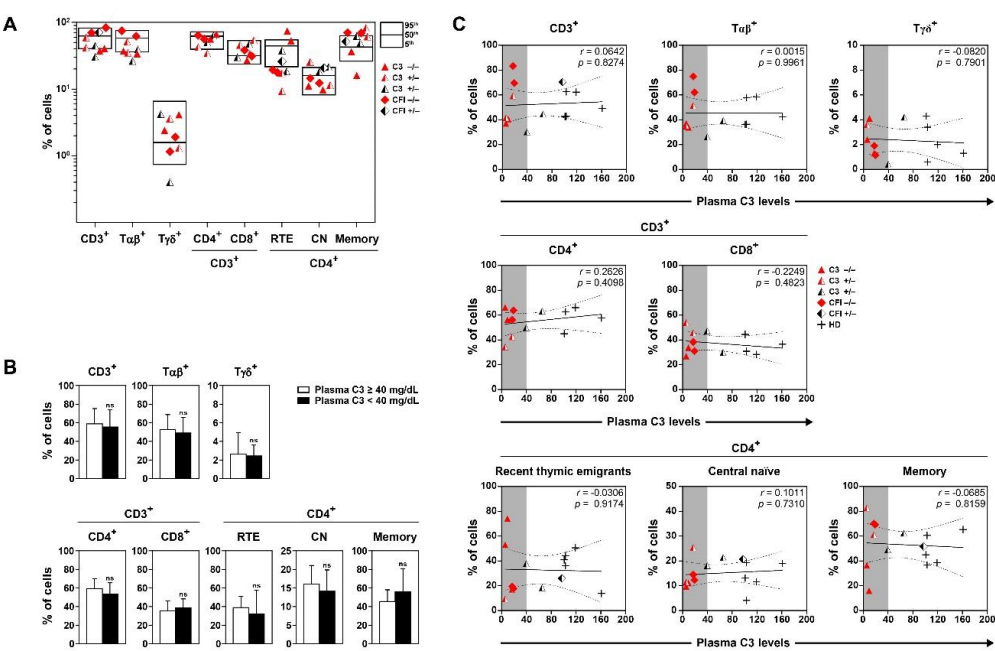
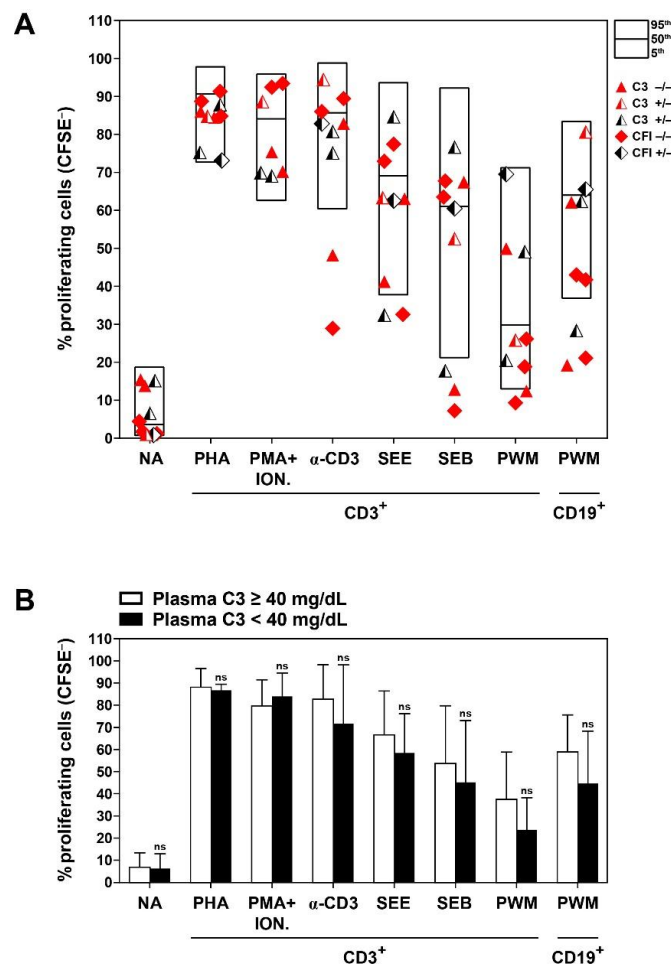


FIG E2. T lymphocyte immunophenotype analysis. **A**, T cell subset distribution compared with normal 5th, 50th and 95th percentiles (boxes; n=13 HD). Each symbol represents an individual from a single experiment. **B**, Statistical analysis comparing T cell subsets (mean+SD) of individuals below (patients) or above (HD + HC) the 40 mg/dL plasma C3 threshold; ns: non-significant. **C**, Correlation between T cell subsets and plasma C3. r: Pearson's correlation coefficient. Solid lines are the best fit after linear regression; dashed lines are their 95% confidence intervals. Gray areas mark the < 40 mg/dL plasma C3 range. Symbols as in Table E1.



452
453
454 **FIG E3.** Lymphocyte proliferation in response to different stimuli. **A**, Scatter dot plots
455 of patients and HC T (CD3⁺) and B (CD19⁺) proliferation in response to the indicated
456 stimuli measured as % CFSE⁻ cells after 5 days compared with normal 5th, 50th and 95th
457 percentiles (boxes; n=18 HD). NA: non-activated (no stimulus). **B**, Statistical analysis
458 comparing lymphocyte responses (mean+SD) of individuals below (patients) or above
459 (HD + HC) the 40 mg/dL plasma C3 threshold: ns: non-significant.
460

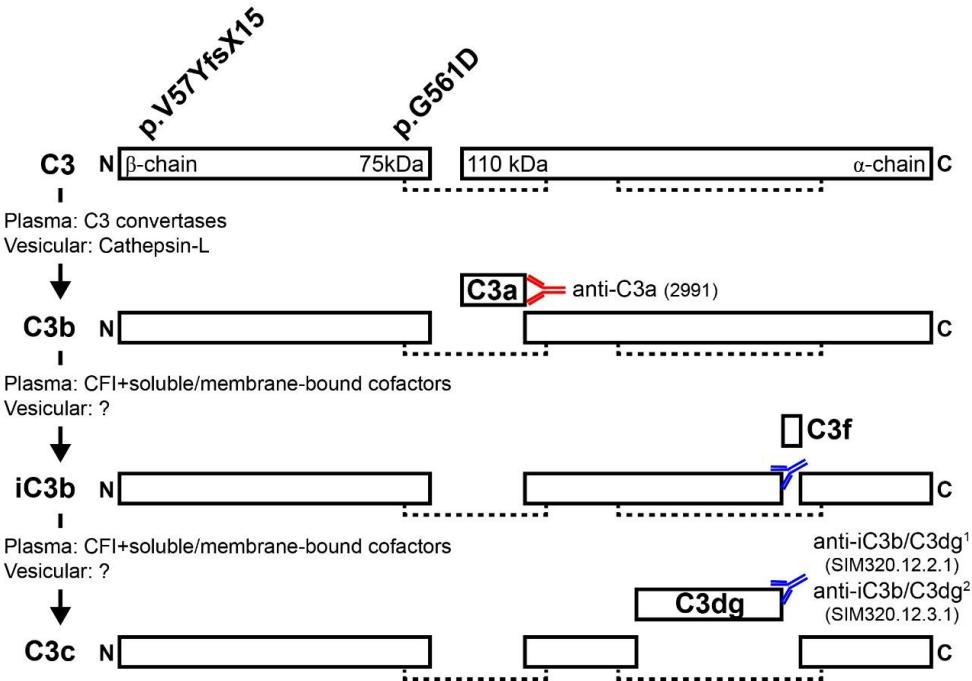


FIG E4. Diagram of native C3 (top) and its fragments and plasma or vesicular enzymes involved, including the binding sites in C3a, iC3b and C3dg of the indicated mAb (clones between brackets). The mutations in plasma C3-deficient patients from Table E1 are shown in native C3.

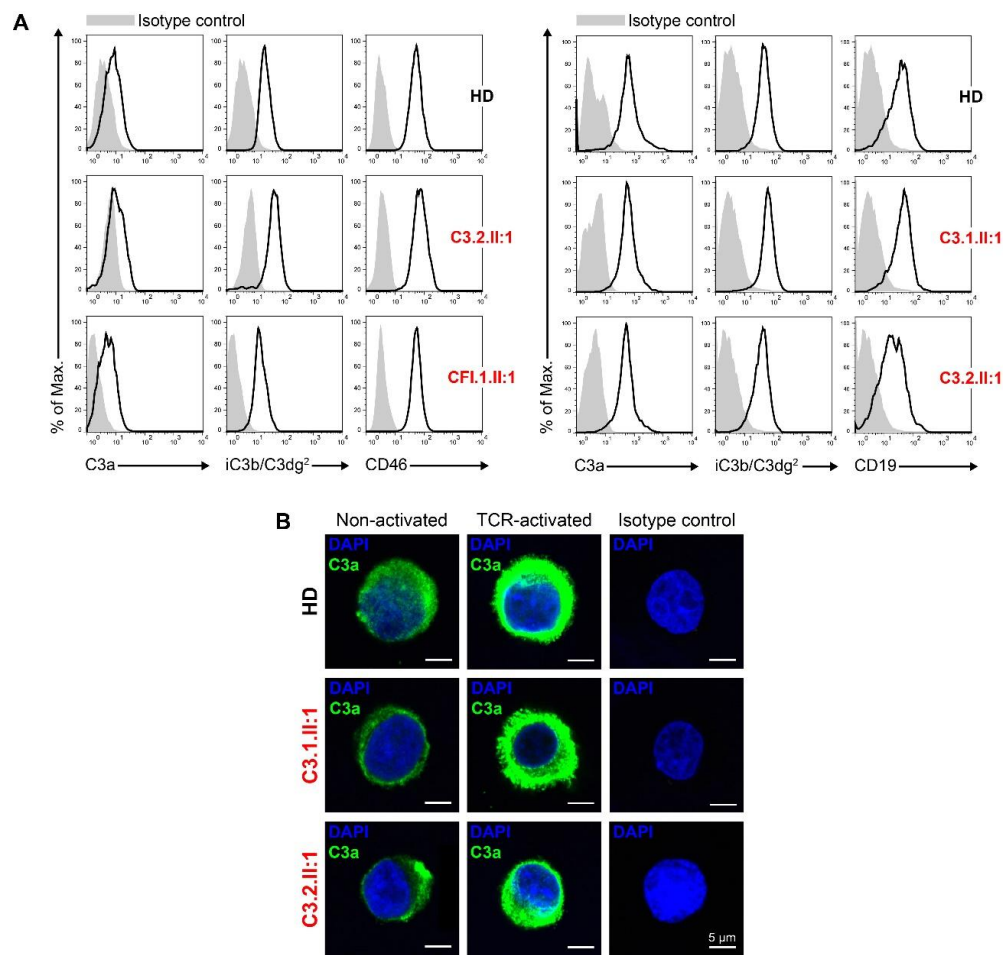


FIG E5. Intracellular C3 analysis in T cell lines from plasma C3-deficient patients. **A**, Representative intracellular C3a, iC3b/C3dg and CD46 or CD19 expression in T (left) and B (right) lymphoblastoid cell lines derived from the indicated primary or secondary plasma C3 deficient patients compared to isotype controls (gray histograms). **B**, Intracellular C3a expression using mAb 2991 in T cell lines from primary plasma C3-deficient patients (C3.1.II:1 and C3.2.II:1) and a HD, before (non-activated) and after TCR activation for 36 hours, measured by confocal microscopy (magnification x100).

479 ONLINE REPOSITORY TABLES
480

TABLE E1. Genetic data and serum C3 (plasma C3) and FI levels.

Family			Mutation							Plasma C3 (mg/dL)		FI (%)
Code	ID	Age‡	Gene	Status§	Exon	Nucleotide	Amino acid	Type¶	≥ 40	< 40#		
C3.1	I:1†	▲	C3	+/-P	2	c.168_169del	p.V57YfsX15	F	65	< 6	ND	76.2
	II:1†	▲		-/-P								
C3.2	I:2†	▲	C3	+/-P	13	c.1682G>A	p.G561D	M	40	9	ND	88.0
	II:1†	▲		-/-P								
C3.3	II:2†	▲	C3	+/-P	13	c.1656G>C	p.W552C	M		17	ND	
C3.4	I:1†	▲	C3	+/-P	24	c.3124C>G	p.R1042G	M		< 6	ND	
CFI.1*	I:2†	◆	CFI	+/-S	5	c.739T>G	p.C247G	M	97	19	ND	0.1
	II:1†	◆		-/-S								
	II:4	◆		-/-S						17		
CFI.2*	II:2	◆	CFI	-/-S	5	c.772G>A	p.A258T	M/Sp		33	2.4	

Normal local ranges for plasma C3 or FI are 75-135 mg/dL or 77-115 % of normal human serum, respectively. Subject identification (ID) as in Fig E1. Red symbols denote individuals with plasma C3 < 40 mg/dL and clinical features and half-white symbols label heterozygous individuals. Black&white symbols identify HC. Triangles identify individuals with mutations in C3 and rhombuses identify individuals with mutations in CFI. Probands are in bold; *families previously described⁴²; †donors for whom T- (HTLV-1) and B- (EBV) lymphoblastoid cell lines were derived; ‡at date of analysis. §: +/-, heterozygous; -/-, homozygous; P, primary plasma C3 deficiency; S, secondary plasma C3 deficiency. ¶: F, frameshift; M, missense; Sp, splicing. #Mean values of 2-6 determinations in most cases. ND, not determined.

481
482

TABLE E2. Vaccine-specific serum immunoglobulins and specific antibodies.

Family			Immunoglobulins			Bacteria			Virus		
Code	ID	Age*	IgG	IgA	IgM	Strep. pneumoniae	Tetanus toxoid	Diphtheria toxoid	Rubella	Varicella	Measles
C3.1	I:1	45	ND	ND	ND	14.0	16.2	0.1	-	+	+
	II:1	13	845	203	97	4.7	26.3	1.3	-	+	+
C3.2	I:2	40	ND	ND	ND	24.7	6.9	0.4	+	+	+
	II:1	8	1630	315	116	88.0	8.5	0.5	+	+	+
C3.3	II:2	35	746	230	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CFI.1	I:2	55	ND	ND	ND	3.6	13.9	0.3	+	+	+
	II:1	36	1130	121	233	5.4	30.1	0.2	+	+	+
	II:4	26	852	226	111	11.7	30.4	0.9	+	+	+
CFI.2	II:2	50	1050	333	110	6.5	3.1	0.03	+	+	+
Normal range			725-1900 mg/dL	50-340 mg/dL	45-280 mg/dL	> 0.1 µg/mL	> 2.4 µg/mL	> 0.01 IU/mL	+	+	+

Identification (ID) as in Fig E1 (probands in bold). *At date of analysis. +: positive. -: negative. ND, not determined.

483

MADRID, 2017

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2017